



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Fitorremediación de cromo con plantas acuáticas flotantes: lineamientos para su implementación en la rehabilitación de cuerpos de agua

Tesis presentada para optar el título de Licenciada en Ciencias Biológicas
de la Universidad de Buenos Aires

Bárbara Marion Gomez

Directora: Dra. Laura de Cabo

Co Director: Lic. Carlos E. Gomez

Directora Asistente: Lic. Valeria Rodriguez Salemi

Lugar de trabajo:

Instituto Nacional del Agua

Museo Argentino de Ciencias Naturales "B. Rivadavia"

Buenos Aires, julio de 2017

Índice general

Lista de Abreviaturas	III
Resumen	v
Agradecimientos	vii
Objetivo General e Hipótesis	xv
1. Metodología Analítica	1
1.1. Determinación de parámetros físico-químicos	2
1.2. Determinación de metales	4
1.2.1. Determinación de metales en agua	5
1.2.2. Determinación de cromo en sedimento	6
1.2.3. Determinación de cromo en tejido vegetal	6
2. Tolerancia al cromo en tres especies de plantas flotantes	9
2.1. Introducción	10
2.2. Objetivo Específico e Hipótesis	11
2.3. Materiales y Métodos	11
2.3.1. Diseño Experimental	11
2.3.2. Determinaciones Analíticas	13
2.3.3. Factor de Bioconcentración	14
2.3.4. Tasa de Crecimiento Relativo (TCR)	14
2.3.5. Análisis estadístico	14
2.4. Resultados y Discusión	15
2.4.1. Variables físico-químicas	15
2.4.2. Toxicidad del cromo	15
2.4.3. Bioacumulación de cromo	16
3. Asimilación de cromo por <i>Salvinia minima</i>	21
3.1. Introducción	22
3.2. Objetivo Específico e Hipótesis	23

3.3. Materiales y Métodos	23
3.3.1. Diseño Experimental	23
3.3.2. Determinaciones analíticas	25
3.3.3. Análisis estadístico	26
3.4. Resultados y Discusión	26
3.4.1. Bioensayo	26
4. Descomposición de <i>Salvinia minima</i> con cromo acumulado	35
4.1. Introducción	36
4.2. Objetivos Específicos e Hipótesis	37
4.3. Materiales y Métodos	37
4.3.1. Análisis de Datos	39
4.3.2. Análisis Estadístico	40
4.4. Resultados y Discusión	40
4.4.1. Caracterización Biológica	40
4.4.2. Variaciones físico-químicas	40
4.4.3. Descomposición a través del tiempo: Pérdida de bio- masa del detrito	43
4.4.4. Descomposición a través del tiempo: liberación de cromo	44
4.4.5. Cambios en el Índice de Acumulación (IA) de cromo durante la descomposición del detrito	45
4.4.6. Análisis del cromo liberado	46
5. Conclusiones y Propuestas	49
A.	55
B.	59
C.	63

Lista de Abreviaturas

CDT: Carbono Disuelto Total
CE: Conductividad Eléctrica
CFSTR: Reactor de Tanque Agitado con Flujo Continuo
CID: Carbono Inorgánico Disuelto
COD: Carbono Orgánico Disuelto
CrD: Cromo Disuelto
CrP: Cromo Particulado
CrT: Cromo Total
DQO: Demanda Química de Oxígeno
EEM: Error Estándar Medio
FBC: Factor de Bioconcentración
IA: Índice de Acumulación
LD: Limite de Detección
LC: Limite de Cuantificación
OD: Oxigeno Disuelto
ORP: Potencial de Óxido-Reducción
PS: Peso Seco
SST: Sólidos Suspendidos Totales
T°: Temperatura
TCR: Tasa de Crecimiento Relativo

Resumen

La contaminación ambiental por metales pesados se ha convertido en un serio problema en el mundo y se agrava cada vez más con el aumento de la industrialización y la alteración de los ciclos biogeoquímicos naturales. El Área Metropolitana de Buenos Aires no es ajena a esta problemática y sus cuencas se encuentran con altos niveles de contaminación con metales pesados. El cromo es uno de metales mayoritarios, sobre todo en los sedimentos. El ingreso de este metal a los cuerpos de agua es principalmente producto del vertido de efluentes sin tratamiento o con tratamientos ineficientes. Los costos de los tratamientos para remoción de metales en muchos casos son elevados y por ende, de difícil implementación para pequeñas y medianas empresas. La fitorremediación es una tecnología amigable con el ambiente, eficiente y de bajo costo. Esta tecnología consiste en el uso de plantas para remover metales. Se las puede emplear en diferentes matrices como agua, suelo y sedimento.

En este trabajo, se estudió la tolerancia y capacidad de remoción de cromo de tres especies de macrófitas acuáticas flotantes: *Lemna gibba*, *Salvinia minima* y *Azolla filiculoides* a diferentes concentraciones de cromo. De todas ellas se seleccionó a *S. minima* ya que demostró una buena tolerancia a un amplio rango de concentraciones y una muy buena capacidad de asimilación de cromo. Se estudió la dinámica de remoción de cromo de esta especie en el tiempo observándose que al cabo de 7 días alcanzaba la saturación en el tejido ($448,1 \pm 40,4$ mg Cr/Kg PS) y no incorporaba más metal. Así mismo, la tasa de asimilación fue máxima a las 24 hs ($117,2 \pm 9,7$ mg Cr Kg⁻¹día⁻¹) decayendo en el tiempo, probablemente por un efecto de toxicidad del metal en el tejido. También se estudió lo que ocurre con el cromo secuestrado en la planta luego que esta muere y empieza a descomponerse. Se observó que luego de la primer semana y antes de los 30 días, el 90 % del cromo retenido en el tejido es liberado al medio y solo un 10 % del mismo queda retenido en el material refractario.

Los datos obtenidos son relevantes para la implementación de esta tecnología en un tratamiento terciario de efluentes contaminados con cromo empleando plantas nativas como *S. minima*. De este trabajo se desprende que con una semana de exposición de la planta al metal es suficiente y que un mayor tiempo de exposición no sería necesario ya que el tejido de la planta satura. Por otro lado, queda en manifiesto la necesidad de cosechar este material vegetal a fin de evitar que el metal retome al medio.

Con la información recabada se estimó las dimensiones de una laguna de tratamiento empleando *S. minima* para tratar un efluente con 5 mg Cr/L y llevándolo a una concentración final de 2 mg Cr/L (límite de vuelco establecido por la Autoridad del Agua (ADA) en la resolución 366/2003). Se estimó la necesidad de una laguna de 30 x 60 x 1,5 metros para tratar un caudal de 69 m³ diarios de efluente. Si bien dichas dimensiones son aproximadas, es importante remarcar su valor orientativo y destacar la importancia de estos ensayos para abordar y mejorar la tecnología para poder proveer a las industrias una alternativa eficiente y sustentable para el tratamiento de sus efluentes.

Agradecimientos

A Laura porque sin conocerme me diste un tema de tesis, me dirigiste y acompañaste en este proceso de formación y aprendizaje.

A Luis y Carlos por apoyarme y brindarme los recursos necesarios para realizar este trabajo en el INA.

A Vale por siempre estar ahí. Por ayudarme con las mediciones y preparativos, por tu lógica que siempre se interpone ante mi ansiedad e impulso, por las palabras de aliento en los días en donde quien sabe por que, todo es negativo, por el compromiso que asumiste con este trabajo, por ser mi compa y amiga.

A mis compañeros del LETS, que siempre estuvieron y están ahí con un mate para arrancar la mañana, con una sonrisa para que el día sea mas llevadero y con la buena onda que los caracteriza. A Cantita, Manu, Silvia, Sotelo y Mary que hicieron mucho por esta tesis y que sin su ayuda todo hubiese sido mas tedioso y difícil.

A los ingenieros: Sergio, Esteban y Pity por su ayuda y por compartir conmigo su mundo de reactores, caudales y ecuaciones diferenciales.

A mis amigas Lin, Vick, Pity, y Romi por aguantarme todos estos años llorar por la lejanía de este día que llega, de este momento que concluye y que sin su apoyo, cenas y risas compartidas hubiese sido imposible estar hoy escribiendo estas palabras.

A mi familia por todo su apoyo, motivación y cariño incondicional.

A mi abuela Celestina que siempre me transmitió la seguridad que este día llegaría aun cuando ni yo lo creyese posible.

A mi compañero, Ariel, por apoyarme en los años mas difíciles de la carrera cuando el tiempo empezaba a pesar y el cansancio a sentirse cada vez mas, por compartir y transmitirme tu pasión por la investigación, por estar siempre, por esperarme con la cena cuando llegaba a cualquier hora de cursar, por los chocolates y tecitos en los momentos críticos de finales y parciales, por quererme, porque te quiero.

Gracias de corazón a cada uno de ustedes por acompañarme y aguantarme en esta etapa de crecimiento y aprendizaje.

Barby.

*Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas,
de pronto, cambiaron todas las preguntas.*
Mario Benedetti

Introducción

La fitorremediación (“fito” que significa planta y el sufijo latino “remedium” que significa limpiar o restaurar) es el uso de plantas y microbios asociados para reducir las concentraciones o efectos tóxicos de los contaminantes en el ambiente. Puede ser utilizada para la remoción de metales pesados y radioisótopos, así como para contaminantes orgánicos (como hidrocarburos aromáticos policíclicos –HAP–, bifenilos policlorados –BPC– y pesticidas). Las plantas pueden remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar estos contaminantes. Esta tecnología es considerada una estrategia de rehabilitación novedosa, rentable, eficiente, ambientalmente amigable, aplicable *in situ* y energéticamente económica y sustentable, ya que funciona con energía solar (Ali et al., 2013).

La principal motivación detrás del desarrollo de las tecnologías de fitoremediación es el potencial para la remediación de bajo costo y su competitividad frente a tecnologías convencionales (Raskin et al., 2000). Aunque el término fitorremediación es relativamente reciente, se ha practicado durante décadas (Cunningham et al., 1997). A pesar de que las plantas muestran cierta capacidad para reducir contaminantes orgánicos (Carman et al., 1998; Cunningham et al., 1995; Gordon et al., 1997), el mayor progreso en la fitorremediación se ha hecho con metales (Salt et al., 1995). Los metales pesados constituyen un grupo cercano a los 40 elementos de la Tabla Periódica que tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm³. El rasgo distintivo de la fisiología de los metales pesados, es que aún cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como el Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, se ha reportado que también tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (Cañizares-Villanueva, 2000).

La contaminación ambiental por metales pesados se ha convertido en un serio problema en el mundo. La movilización de metales pesados a través de la extracción de minerales y posterior procesamiento para diferentes aplicaciones ha llevado a la liberación de estos elementos en el medio ambiente. El problema de la contaminación de los metales pesados es cada vez más serio con el aumento de la industrialización y la alteración de los ciclos biogeoquímicos naturales. A diferencia de las sustancias orgánicas, los metales pesados son esencialmente no biodegradables. La acumulación de metales pesados en los suelos y aguas supone un riesgo para la salud ambiental y humana. Estos elementos se acumulan en los tejidos corporales de los organismos vivos (bioacumulación) y sus concentraciones aumentan a medida que pasan de niveles tróficos inferiores a niveles tróficos más altos. Los metales pesados provienen de la meteorización de las rocas y de la actividad volcánica. Las fuentes antropogénicas incluyen minería, fundición, galvanoplastia, uso de plaguicidas y fertilizantes (fosfato), así como biosólidos en la agricultura, entre otros. En cuanto a sus toxicidades, los metales pesados más problemáticos son Hg, Cd, Pb, Cu, Zn, Sn y Cr.

El cromo existe en varios estados de oxidación, pero las formas más estables y comunes son Cr (0), el Cr trivalente (III) y el hexavalente Cr (VI). Cr (0) es la forma metálica, producida en la industria y es un sólido con alto punto de

fundamentalmente utilizado para la fabricación de acero y otras aleaciones. El Cr hexavalente en las formas de: cromato (CrO_4^{2-}), dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) y CrO_3 se considera la forma más tóxica de cromo, ya que presenta alto potencial oxidante, alta solubilidad y movilidad a través de las membranas en organismos vivos y en el ambiente. El Cr (III) en forma de óxidos, hidróxidos y sulfatos es menos tóxico, ya que es relativamente insoluble en agua, presenta menor movilidad y está principalmente ligado a la materia orgánica en el suelo y en los ambientes acuáticos.

El cromo entra en las plantas por reducción y/o complejación por exudados radiculares, tales como ácidos orgánicos, que aumentan la solubilidad y movilidad de Cr a través del xilema de la raíz (Bluskov et al., 2005). Tanto el Cr (VI) como el Cr (III) entran en las células de las raíces por la vía simplástica, donde el Cr (VI) se reduce y se acumula en la corteza (Shanker et al., 2005). Aunque este metal es pobremente translocado a las partes aéreas, se moviliza y se acumula dentro de los tejidos dependiendo de su forma química (James and Bartlett, 1983). El Cr (VI) presenta una mayor toxicidad ya que daña las membranas de las raíces porque tiene un alto poder de oxidación. Además, se ha descrito que reduce la absorción de los elementos esenciales como: Fe, K, Mg, Mn, P y Ca (Gardea-Torresdey et al., 2005). Zayed and Terry (2003) reportaron que la absorción de los iones SO_4^{2-} y Ca^{2+} es inhibida por el Cr (VI) ya que este compite con estos iones por las vías de ingreso a la célula mientras que el Cr (III) entra a la célula por un mecanismo pasivo. Por otro lado, debido a su similitud en el radio iónico, el Cr (III) sustituye al Fe (III) en las proteínas hemo, disminuyendo su actividad (Pandey and Sharma, 2003) y produciendo un efecto tóxico sobre el organismo.

En la provincia de Buenos Aires, el vuelco de cromo a colectora cloacal o cuerpos de agua superficial, esta regulado por la Autoridad de Agua (el ADA) la cual dispone mediante la resolución 366/2003 una concentración < 2 mg/L de cromo total y < 0.2 mg/L para el cromo hexavalente. Por otro lado, la ley 24.051 (residuos peligrosos) bajo el decreto 831/93 dispone una concentración cromo total < 2 $\mu\text{g/L}$ para la protección de la vida acuática. A pesar de la reglamentación vigente en nuestro país, las grandes cuencas del AMBA (Área Metropolitana de Buenos Aires) se encuentran contaminadas con altos niveles de cromo debido al vertido sin tratamiento de las industrias a los cursos de agua.

El tratamiento de los efluentes industriales es un punto primordial para la protección de los cuerpos de agua y la salud de la población. A pesar de las leyes y los esfuerzos de los entes reguladores, nuestro país presenta numerosos problemas ambientales a causa del escaso, ineficiente o nulo control de los vuelcos. En muchos casos, los tratamientos de efluentes no se llevan a cabo principalmente por cuestiones económicas. Disponer de tecnologías de tratamiento de bajo costo como la fitorremediación puede promover y estimular la implementación de tratamientos de efluentes por parte de las industrias.

Objetivo General e Hipótesis

Objetivo General:

Se pretende profundizar en el conocimiento de la dinámica de remoción y liberación de cromo por plantas acuáticas nativas con el fin de determinar su efectividad y aplicabilidad en el manejo y rehabilitación de sistemas acuáticos contaminados por cromo.

Las hipótesis de trabajo planteadas son:

1. Las plantas soportan un amplio rango de concentraciones y su capacidad de absorción será mayor al incrementar la concentración de cromo en el medio.
2. A concentración constante, la tasa de asimilación del metal será máxima en los primeros días del ensayo pero irá disminuyendo en el transcurso del mismo.
3. Las plantas al descomponerse liberan al medio parte del cromo que bioacumularon en los tejidos.

Capítulo 1

Metodología Analítica

En este capítulo se detallan las metodologías generales empleadas en los diferentes ensayos en relación al pre-tratamiento de las muestras y la determinación de los parámetros físico-químicos en agua, sedimento y tejido.

1.1. Determinación de parámetros físico-químicos

Las muestras de agua fueron colectadas, previa homogeneización, en envases de vidrio ámbar o plástico dependiendo de la determinación (APHA, 1998). Se preservaron y conservaron a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del análisis. Los parámetros analizados fueron: amonio, nitratos, ortofosfatos, fósforo total, carbono orgánico disuelto (COD), carbono inorgánico disuelto (CID), Carbono Disuelto Total (CDT), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Alcalinidad, Dureza, Sólidos Suspendidos Totales (SST), sulfuros, sulfatos, cloruros, sodio, potasio, magnesio, calcio, hierro, cobre, cinc, cromo total, cromo disuelto y cromo (VI).

Las muestras de sedimentos fueron colectadas en envases de polietileno y conservadas a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del análisis. En esta matriz solo se determinó cromo total.

Todas las determinaciones realizadas en este trabajo fueron siguiendo los protocolos estandarizados por APHA y US EPA. En la tabla 1.1 se detallan los límites de detección (LD), cuantificación (LC) y la referencia de la técnica empleada.

Tabla 1.1: Límite de Detección (LD), Limite de Cuantificación (LC), y referencia de los parámetros analizados

Parámetro	Unidad	LD	LC	Referencia
Alcalinidad	mg CaCO ₃ /L	—	20	SM 20 th 2320-B
Conductividad	μS/cm	—	0,1	SM 20 th 2510-B
Dureza Total (por cálculo)	mg CaCO ₃ /L	—	10	SM 20 th 2340-B
pH	upH	—	0,1	SM 20 th 4500-B
Temperatura	°C	—	0,1	SM 20 th 2550-B
Carbono Orgánico Disuelto (COD)	mg/L	—	0,1	SM 20 th 5310-B
Carbono Total Disuelto (CTD)	mg/L	—	0,1	SM 20 th 5310-B
Carbono Inorgánico Disuelto (CID)	mg/L	—	0,1	SM 20 th 5310-B
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	—	10	SM 20 th 5220-D
Fósforo total	mgP/L	—	0,5	SM 20 th 4500-P-B y C
Nitrógeno amoniacal	mgN/L	—	0,1	SM 20 th 4500-NH ₃ -B / SM 13 th 132-B
NTK	mgN/L	—	0,05	SM 20 th 4500-NH ₃ -B / SM 20 th 4500-N _{org} -B / SM 13 th 132-B
Sulfuros	mg/L	0,01	0,03	SM 20 th 4500-S ²⁻ -D
Ortofosfatos	mgP-PO ₄ ³⁻ /L	0,01	0,03	SM 20 th 4500-P-E
Cloruros	mg/L	—	4	SM 20 th 4500-Cl ⁻ -B
Nitratos	mg/L	—	1,0	SM 20 th 4500-NO ₃ ⁻ -B
Nitritos	mgNO ₂ /L	—	0,001	Hach 8507
Sulfatos	mg /L	—	10	SM 20 th 4500-SO ₄ ²⁻ -E
Calcio (total)	mg/L	1,0	2,5	SM 20 th 3111 A y B, (llama)
Cobre (total)	mg/L	0,010	0,050	SM 20 th 3111 A y B, (llama)
Cromo (Hexavalente)	mg/L	0,005	0,010	EPA 7196 A
Cromo (total)	mg/L	0,012	0,050	SM 20 th 3111 A y B, (llama)
Cromo (total) en sedimento	mg/Kg	2,3	11,7	SM 20 th 3111 A y B, (llama)
Cromo (trivalente)	mg/L	—	0,050	por diferencia entre total y hexavalente
Hierro (total)	mg/L	0,01	0,050	SM 20 th 3111 A y B, (llama)
Magnesio (total)	mg/L	0,03	0,1	SM 20 th 3111 A y B, (llama)
Manganeso (total)	mg/L	0,01	0,05	SM 20 th 3111 A y B, (llama)
Potasio (total)	mg/L	0,5	1	SM 20 th 3111 A y B, (llama)
Sodio (total)	mg/L	1	5	SM 20 th 3111 A y B, (llama)
Cinc (total)	mg/L	0,005	0,03	SM 20 th 3111 A y B, (llama)
Digestión de metales en sedimento	—	—	—	EPA 3051
Digestión de metales en agua	—	—	—	EPA 3015
Digestión de metales en tejido vegetal	—	—	—	EPA 3052
Filtración para metales disueltos	—	—	—	SM 20 th 3030B

1.2. Determinación de metales

El análisis por absorción atómica se utiliza comúnmente para la determinación de metales en muestras ambientales. Esta técnica se basa en la absorción de luz monocromática por una nube de átomos del metal del analito. La luz monocromática puede ser producida por una fuente compuesta por los mismos átomos que los analizados. La fuente produce intensa radiación electromagnética con una longitud de onda exactamente igual a la absorbida por los átomos, lo que resulta en una selectividad extremadamente alta. Los componentes básicos de un instrumento de absorción atómica se muestran en la Figura 1.1. El elemento clave es la lámpara de cátodo hueco en la que los átomos del metal del analito se activan de tal manera que se excitan electrónicamente y emiten radiación con una banda de longitud de onda muy estrecha característica del metal. Esta radiación es guiada por la óptica apropiada a través de una llama en la que se aspira la muestra. En la llama, la mayoría de los compuestos metálicos se descomponen, y el metal se reduce al estado elemental, formando una nube de átomos. Estos átomos absorben una fracción de radiación en la llama. La fracción de radiación absorbida aumenta con la concentración del elemento buscado en la muestra de acuerdo con la relación de la ley de Beer. El haz de luz atenuado pasa luego a un monocromador para eliminar la luz expúrea resultante de la llama, y luego a un detector (Manahan, 2010, pp. 682).

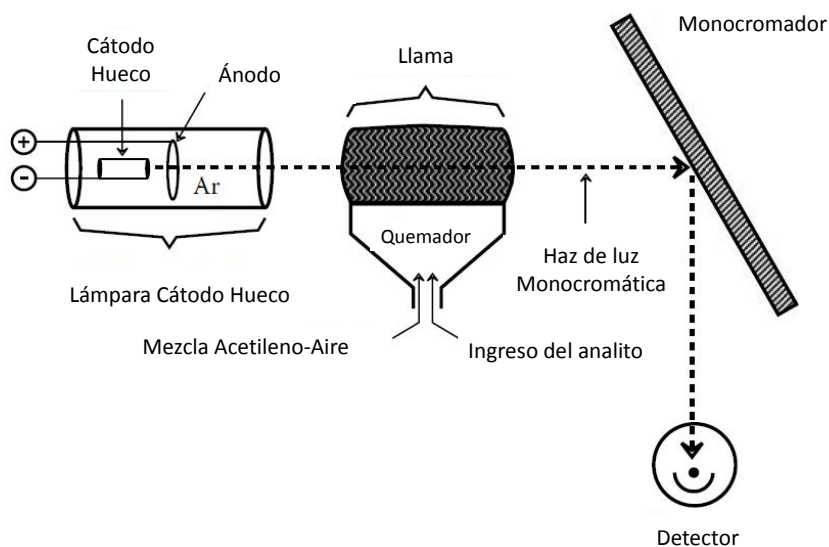


Figura 1.1: Componentes básicos de un espectrofotómetro de absorción atómica

Las muestras que contienen material particulado o cuyos metales están retenidos en una matriz orgánica, requieren un pre-tratamiento antes del análisis espectroscópico. Este pre-tratamiento consiste en la mineralización de la muestra mediante digestión ácida. El objetivo de este proceso es reducir interferencias debido a la presencia de materia orgánica y convertir los metales asociados al material particulado a una forma (generalmente el metal libre) tal que pueda ser determinada por el espectrofotómetro de absorción atómica. La digestión asistida por microondas es uno de los métodos más rápidos y eficientes utilizados para la mineralización de muestras ambientales. Consiste en la exposición de la muestra a una rampa de presión y temperatura en condiciones ácidas. El ácido empleado en este tipo de digestiones es el ácido nítrico (HNO_3). Finalizado este pre-tratamiento la muestra está lista para ser analizada mediante el espectrofotómetro de absorción atómica.

1.2.1. Determinación de metales en agua

Los ‘metales totales’ incluyen todos los metales, inorgánicos y orgánicos tanto particulados como disueltos. Mientras que los ‘metales disueltos’ son aquellos que pasan por una membrana de acetato de celulosa de $0.45 \mu\text{m}$. Las muestras fueron colectadas en envases de polietileno y preservadas con HNO_3 concentrado hasta $\text{pH} < 2$. Cuando se determinaron metales disueltos la muestra fue filtrada por acetato de celulosa $0.45 \mu\text{m}$ y luego preservada. Todo el material de vidrio con el que se trabajó así como los envases donde fueron colectadas las muestras, se encontraban lavados con HNO_3 al 15 % y enjuagados con agua des-ionizada.

La digestión ácida se realizó por microondas marca CEM (Figura 1.2.d) siguiendo el protocolo establecido por la EPA 3015 (Kingston, 1994). Una vez que la muestra se hallaba digerida, fue analizada en el espectrofotómetro de absorción atómica marca Hitachi modelo Z5000 (Figura 1.2.f). Las muestras fueron cuantificadas a partir de curvas de calibración elaboradas en el mismo día. En la tabla 1.2 se detalla la cantidad de estándares utilizados en cada curva, el rango lineal de la misma y los límites de cuantificación (LC) y detección (LD) empleados.

Tabla 1.2: Cantidad de estándares utilizados, rango lineal, límite de cuantificación (LC) y detección (LD) empleados para la determinación de metales en agua

Metal	N° Estándares	Rango (mg/L)	LD (mg/L)	LC (mg/L)
Cr	6	0-1	0,012	0,05
Zn	6	0-1	0,005	0,03
Cu	7	0-5	0,010	0,050
K	6	0-12,5	0,5	1,0
Fe	7	0-2	0,01	0,05
Mg	6	0-0,8	0,03	0,1
Ca	7	0-20	1,0	2,5
Mn	7	0-2	0,01	0,05

En todos los casos el criterio utilizado para aceptar una curva de calibración fue: una recuperación de los estándares entre 85 y 110 % y un coeficiente de correlación $r^2 > 0,95$.

1.2.2. Determinación de cromo en sedimento

Las muestras fueron colectadas en envases de polietileno previamente lavados con HNO_3 al 15 % y enjuagados con agua des-ionizada. Para la determinación del metal en el sedimento, se realizó una digestión ácida por microondas marca CEM siguiendo el protocolo establecido por la EPA 3051. Una vez que la muestra se hallaba digerida, fue analizada en el espectrofotómetro de absorción atómica marca Hitachi modelo Z5000. Las muestras fueron cuantificadas a partir de curvas de calibración elaboradas en el mismo día. En la tabla 1.3 se detalla la cantidad de estándares utilizados en cada curva, el rango lineal de la misma y los límites de cuantificación (LC) y detección (LD) empleados.

Tabla 1.3: Cantidad de estándares utilizados, rango lineal, límite de cuantificación (LC) y detección (LD) empleados para la determinación de cromo en sedimento

Metal	N° Estándares	Rango (mg/L)	LD (mg/Kg)	LC (mg/Kg)
Cr	6	0-2	2,3	11,7

1.2.3. Determinación de cromo en tejido vegetal

Las muestras de tejido vegetal fueron colectadas y enjuagadas con agua des-ionizada. Luego se escurrieron y colocaron en papel absorbente para eliminar el resto de agua. El material seco se colocó en estufa a 70°C durante una semana.

Se llevó a peso constante y molió hasta obtener una polvo fino y homogéneo. Se digirió por microondas según el protocolo de EPA 3052 (USEPA, 1995) (Figura 1.2).

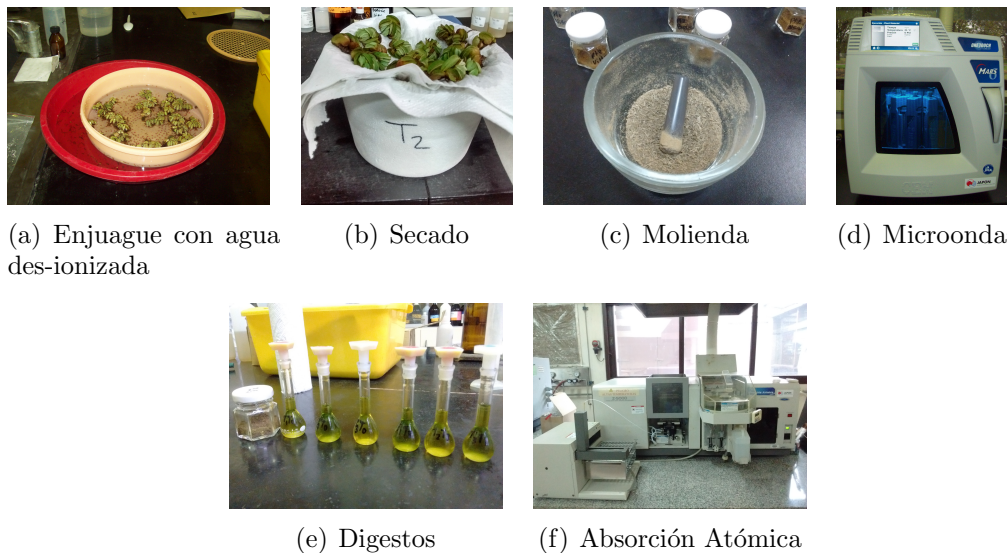


Figura 1.2: Pasos seguidos en la determinación de cromo en tejido vegetal: (a) Enjuague con agua des-ionizada, (b) Secado, (c) Molienda del material vegetal seco, (d) Microondas CEM modelo Mars 6, (e) Digestos y (f) Absorción Atómica Hitachi Z5000.

Una vez que la muestra se hallaba digerida, fue analizada en el espectrofotómetro de absorción atómica marca Hitachi modelo Z5000. Las muestras fueron cuantificadas a partir de curvas de calibración elaboradas en el mismo día. En la tabla 1.4 se detalla la cantidad de estándares utilizados en cada curva, el rango lineal de la misma y los límites de cuantificación (LC) y detección (LD) empleados.

Tabla 1.4: Cantidad de estándares utilizados, rango lineal, límite de cuantificación (LC) y detección (LD) empleados para la determinación de cromo en tejido

Metal	N° Estándares	Rango (mg/L)	LD (mg/Kg PS)	LC (mg/Kg PS)
Cr	6	0-2	2,3	11,7

Capítulo 2

Tolerancia al cromo en tres especies de plantas flotantes

2.1. Introducción

Las especies de plantas nativas cuentan con una larga historia de selección natural en el ambiente. En el largo plazo, estas plantas han sido capaces de sobrevivir, crecer y reproducirse en los extremos ambientales propios del lugar, particularmente en las condiciones climáticas adversas, como las inundaciones y sequías, así como el tipo de suelo. Se hallan fuertemente adaptadas a su entorno original, donde han logrado relaciones de simbiosis con otras especies, proporcionándose múltiples beneficios (Adams and Lamoureux, 2005). Las plantas nativas también son importantes para mantener la estabilidad de los ecosistemas, ya que forman parte de la red trófica del lugar. Tienen predadores naturales, como insectos y otros herbívoros, que al alimentarse de ellas controlan su crecimiento poblacional, impidiendo que se transformen en plagas. A su vez, sirven de refugio y alimento para la vida silvestre y atraen a la fauna local. El uso de plantas nativas favorece la preservación del paisaje autóctono, así como de su flora y fauna asociadas. Es por esto que el estudio de especies nativas resulta de suma importancia para su aplicación en técnicas de fitorremediación. Varias especies de macrófitas flotantes han demostrado una gran capacidad de tolerancia y absorción de cromo (Delgado et al., 1993; Dhir et al., 2009; Maine et al., 2004; Prado et al., 2010). En el ámbito local, se ha trabajado en ensayos de laboratorio con *Lemna gibba* y *Lemna minor* como acumuladoras de Cd, Cr y Cu (Sobrero et al., 2004); *Salvinia minima* como acumuladora de cobre (Casares et al., 2014); *Salvinia herzogii* y *Pistia stratiotes* evaluadas con Cd y Cr (Suñe et al., 2007); *Salvinia herzogii*, *Pistia stratiotes*, *Hydromistia stolonifera* y *Eichhornia crassipes* para la remoción de Cd (Maine et al., 2001); *E. crassipes* como acumuladora de cobre (Melignani et al., 2015); *P. stratiotes*, *Spirodela intermedia* y *L. minor* para la remoción simultánea de Fe, Cu, Mn, Zn, Cr y Pb (Miretzky et al., 2004) o en humedales artificiales con *S. herzogii*, *E. crassipes*, *P. stratiotes* y para el tratamiento de efluentes industriales con Cr, Ni y Zn (Hadad et al., 2006; Maine et al., 2007, 2009). Incluso hay estudios del uso de biomasa muerta de *S. intermedia*, *P. stratiotes* y *L. minor* para la remoción simultánea de Cd, Ni, Zn, Cu, y Pb (Miretzky et al., 2006) y de *Azolla filiculoides* para remoción de Cd, Ni, Zn y Pb (Rakhshae et al., 2006), como algunos ejemplos. También hay evidencias de plantas flotantes y palustres acumuladoras analizadas en sus ambientes naturales: *E. crassipes*, *Eichhornia azurea*, *Ludwigia helminthoriza*, *Cyperus longus*, *Marsilea quadrifolia*, *Neptunia oleracea* y *Polygonum punctatum* en humedales colombianos analizadas por su acumulación de Hg, Cu, Pb, Cd y Zn (Núñez et al., 2011); *Stuckenia filiformis* por la acumulación de Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, y Zn en Córdoba, Argentina (Harguinteguy et al., 2014), entre otros.

Los helechos de la familia Salviniacea tienen una amplia distribución geográfica en las regiones tropicales y subtropicales del mundo y se ha reportado que poseen una productividad muy alta, en el rango de 5,8 a 11,4 g de peso seco $m^{-2} d^{-1}$, en un medio químicamente definido de Hoagland (Agami and Reddy, 1989). Otro

helecho con una amplia distribución geográfica son los de la familia Azollaceae. Dentro de esta familia podemos encontrar a *Savinia minima* y a *Azolla filiculoides*, respectivamente, ambas nativas y con una amplia distribución en Argentina. *A. filiculoides* tiene la particularidad de realizar simbiosis con una cianobacteria (*Anabaena azollae*) la cual cuenta con la capacidad de fijar nitrógeno mediante una estructura especializada, el heterocisto. De esa forma, esta planta acuática está provista de una fuente de nitrógeno permanentemente. Las plantas de la familia Lemnaceas, especies conocidas comúnmente como lentejas de agua, se distribuyen en zonas cálidas y templadas de todo el mundo, desde las aguas dulces hasta las salinas, y desde una amplia gama de condiciones tróficas (Hillman and Culley, 1978). Se las puede encontrar en ambientes ricos en nutrientes como pantanos, pequeños estanques o arroyos ricos en materia orgánica. Dentro de esta familia se encuentra *Lemna gibba*. (Ater et al., 2006) resaltan a *Lemna gibba* como una potencial especie para la fitorremediación de aguas residuales contaminadas con cromo y cobre y destacan la capacidad de esta especie sobre otras de la misma familia como *Lemna minor*.

Tanto *L. gibba* como *A. filiculoides* y *S. minima* son nativas de los arroyos Pampeanos y características de zonas de baja corriente (Feijoó and Lombardo, 2007), cumplen un rol primordial en el ecosistema y se sabe que tienen capacidad de tolerar y acumular cromo (Ater et al., 2006; Olgún et al., 2002; Prado et al., 2010; Rakhshaei et al., 2006; Zhao and Duncan, 1997).

En este capítulo se estudiará la capacidad de estas tres especies para remover cromo en un amplio rango de concentraciones y se determinará cual es la más tolerante y eficiente para dicha tarea.

2.2. Objetivo Específico e Hipótesis

Objetivo Específico:

1. Evaluar la tolerancia y capacidad de remoción de cromo en tres especies de plantas flotantes nativas de los arroyos pampeanos: *Lemna gibba*, *Salvinia minima* y *Azolla filiculoides*.

Hipótesis:

1. Las plantas tolerantes a la exposición con cromo pueden acumular el metal en sus tejidos.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Diseño Experimental

En este trabajo se utilizaron tres especies de macrófitas flotantes libres: *Lemna gibba*, *Salvinia minima* y *Azolla filiculoides* (Figura 2.1). Las plantas provinieron de

cultivos libres de cromo mantenidos al aire libre en el Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN) y fueron aclimatadas a las condiciones del invernáculo durante siete días previos al inicio del ensayo. El rango de concentraciones de cromo al que fueron expuestas las plantas fue amplio (1 a 20 mg/L). Fue definido en base al reportado en bibliografía para esas especies (Ater et al., 2006; Miretzky et al., 2004; Olgúin et al., 2002; Prado et al., 2010). El objetivo de trabajar en un rango amplio fue el de establecer umbrales de toxicidad al cromo aproximados para llevar a cabo los experimentos posteriores. La fuente de cromo 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 era de 21 g Cr⁶⁺/L y H₂SO₄ al 1 %.

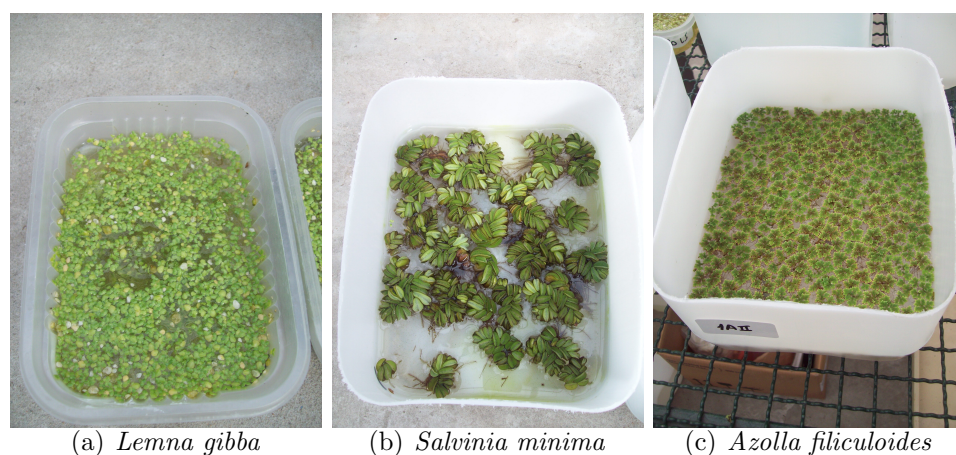


Figura 2.1: Especies utilizadas en la experiencia.

El ensayo se llevó a cabo a fines de abril de 2014 en el invernáculo con fotoperíodo natural y temperatura entre los 20 y 24°C. Consistió en la exposición de tres especies de plantas flotantes *Lemna gibba*, *Salvinia minima* y *Azolla filiculoides* durante siete días a cuatro concentraciones de cromo total (1, 5, 10, y 20 mg CrT/L) por triplicado (n=3). Los recipientes utilizados fueron bateas de plástico de 40 cm x 25 cm x 20 cm. El volumen total en cada unidad experimental fue de un litro y las diluciones del efluente se realizaron con medio de cultivo (Tabla 2.1) para asegurar la presencia de nutrientes en cada uno de los tratamientos del ensayo.

Tabla 2.1: Medio de cultivo APHA modificado (Peterson and Moody, 1997) utilizado en los ensayos y en la aclimatación de las plantas

Sustancia	Concentración Sc. Stock (g/L)	Solución Stock ¹
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	9,0·10 ⁻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	

Las plantas fueron colocadas en cada una de las unidades de ensayo cubriendo el 50 % de la superficie de las mismas. Simultáneamente, se llevaron a cabo controles para cada especie en medio nutritivo APHA modificado (Peterson and Moody, 1997) sin agregado de cromo. La pérdida de agua en las bateas durante el ensayo por procesos de transpiración y evaporación fue compensada con agua destilada, a fin de evitar el efecto de concentración del contaminante y de los nutrientes durante el ensayo. Al finalizar el mismo, se registraron los volúmenes de agua de cada unidad experimental para corregir las concentraciones de cromo. Todas las plantas fueron cosechadas, lavadas cuidadosamente con agua destilada y secadas en estufa a 70°C (Capítulo 1; Sección 1.2.3) para determinar la concentración de Cr T en el tejido.

2.3.2. Determinaciones Analíticas

En cada unidad experimental se midieron al inicio y final del ensayo: pH, temperatura, conductividad eléctrica (CE), oxígeno disuelto (OD) con sensores marca Hanna, y contenido de cromo total (Cr T) en tejido vegetal (Sección 1.2.3) y agua (Sección 1.2.1). Para la determinación de cromo bioacumulado, se utilizó la planta total molida sin diferenciar partes aéreas y sumergidas.

¹se tomaron 10 ml de cada solución stock por cada litro de medio preparado

2.3.3. 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).

$$FBC = \frac{P}{E} \quad (2.1)$$

Donde: “P” representa la concentración del elemento traza en el tejido de las plantas (mg/Kg PS) 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.

2.3.4. Tasa de Crecimiento Relativo (TCR)

La tasa de crecimiento relativo (TCR) fue calculada según la Ecuación 2.2 de (Hunt, 1990).

$$TCR = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{T_2 - T_1} \quad (2.2)$$

Donde TCR es la tasa de crecimiento relativo (día^{-1}), W_1 y W_2 es el peso seco inicial y final, respectivamente, y $(T_2 - T_1)$ es el período experimental.

2.3.5. Análisis estadístico

Los resultados fueron representados por los valores medios de las determinaciones y su Error Estándar Medio (EEM). Las diferencias del FBC entre los tratamientos dentro de la misma especie así como las diferencias de TCR entre los tratamientos de la misma especie con respecto al control, fueron examinadas mediante ANOVA de un factor. Las variables fueron testeadas para homogeneidad de varianzas usando el test de Levene y Normalidad usando la prueba de Shapiro-Wilks. Cuando se hallaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizaron comparaciones con el test de Tukey. Además se realizaron regresiones para establecer relaciones entre las variables cromo acumulado en tejido y la concentración de cromo en solución.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando Infostat versión 2016 (Di Rienzo et al., 2016). Se consideraron diferencias significativas a $p < 0,05$.

2.4. Resultados y Discusión

2.4.1. Variables físico-químicas

La conductividad eléctrica se mantuvo constante entre el inicio y final del ensayo. No se observaron cambios significativos entre el pH inicial y final, evidenciando que el efecto buffer provisto por el medio de cultivo fue suficiente para compensar el agregado del efluente. El oxígeno disuelto fue mayor al finalizar el ensayo (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Parámetros medidos en cada unidad experimental. Se informa el promedio y el intervalo de confianza del 95 % (n=45).

Variable (unidad)	Inicial	Final
pH	7,1± 0,1	7,0± 0,1
CE ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	613± 5	573± 22
OD (mg/L)	8,7± 0,2	10,1± 0,4
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	18,4± 0,1	22,3± 0,1

2.4.2. Toxicidad del cromo

La tolerancia se evaluó a partir de la tasa de crecimiento relativo (TCR). Se hallaron diferencias significativas (p-valor=0,0130) en el TCR para *A. filiculoides* en el tratamiento de 20 mg Cr/L, manifestando un efecto toxico a esta concentración (Figura 2.2). Por otro lado, si bien se observa una tendencia decreciente del TCR con el aumento de la concentración de cromo para *L. gibba*, no se observaron diferencias que fueran significativas con respecto al control (p-valor=0,1153). Ater et al. (2006) han calculado la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para esta especie evaluada mediante el desarrollo de frondes. Obtuvieron una CI_{50} de 7 mg Cr/L. Sin embargo, otros autores, encontraron que el crecimiento de *Lemna gibba* se inhibió en gran medida a partir de 1 mg/L cuando las plantas fueron tratadas con Cr^{51} (Staves and Knaus, 1985). No se hallaron diferencias significativas en el TCR para *S. minima* (p-valor=0,0459) manifestando tolerancia al cromo en todo el rango de concentraciones evaluado (Apéndice A.1).

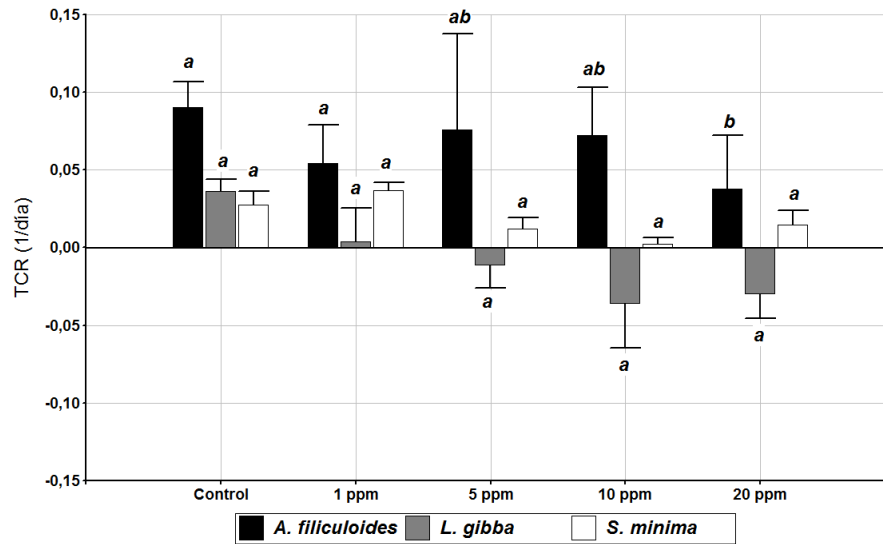


Figura 2.2: Tasa de Crecimiento Relativo (TCR) para cada una de las especies en los diferentes tratamientos. Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95 % (n=3). Medias con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

2.4.3. Bioacumulación de cromo

En la Figura 2.3 se observa la concentración de cromo bioacumulada por cada especie para cada uno de los tratamientos. No se detectó cromo en las plantas control pero si en las plantas expuestas a los diferentes tratamientos. Independientemente de la especie, se observó un incremento en la concentración de cromo bioacumulada conforme al incremento de la concentración en la solución.

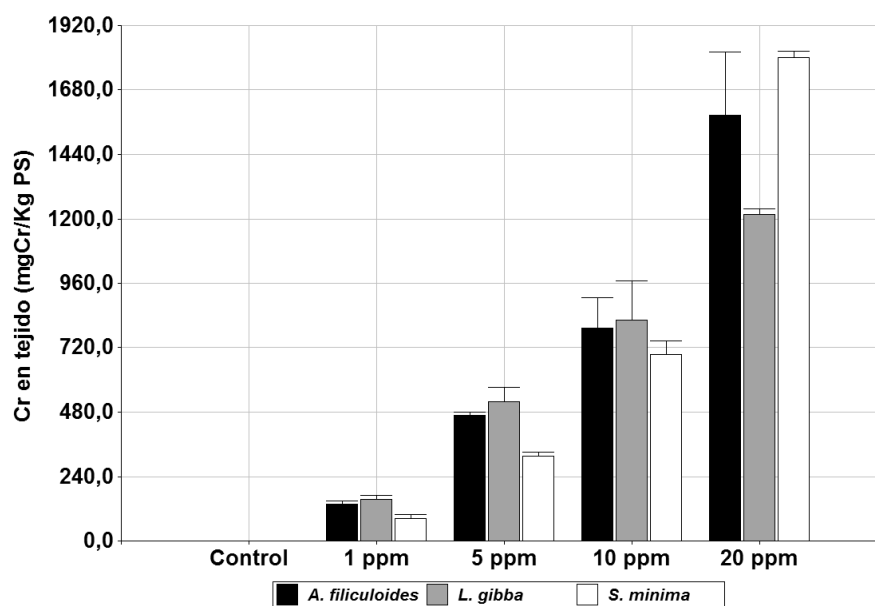


Figura 2.3: Concentración de cromo en tejido para cada tratamiento y especie. Las barras de error representan el EEM (n=3).

Los rangos de concentración obtenidos para las especies estudiadas fueron: 0,20-1,25 g/Kg PS para *Lemna gibba*, 0,15-1,18 g/Kg PS para *Azolla filiculoides* y entre 0,06-1,83 g/Kg PS para *Salvinia minima*. Estos, estuvieron en el mismo orden que valores reportados por otros autores : 0,75-1,7 g/Kg PS para *L.gibba* (Ater et al., 2006), 0,04 y 2,87 g/Kg PS para *Lemna minor* (Zayed et al., 1998), 0,025-3,70 g/Kg PS en *Raphanus sativus* (Tiwari et al., 2013) y 0,03-0,79 g/Kg PS para *Eichhornia crassipes* (Mishra et al., 2009).

Con el fin de analizar si había una regresión significativa entre la cantidad de cromo bioacumulado y la concentración de cromo en la solución, se realizaron regresiones lineales para cada especie entre estas dos variables. Se obtuvieron regresiones significativas para *Lemna gibba*, *Azolla filiculoides* y *Salvinia minima* ($p < 0,0001$; $r^2 0,92$, $p < 0,0001$; $r^2 0,92$ y $p < 0,001$; $r^2 0,97$, respectivamente)(Figura 2.4). Los resultados obtenidos del análisis de regresión confirman que el metal removido por las tres macrófitas es proporcional a las concentraciones del metal en solución. Staves and Knaus (1980; 1985) reportaron esta misma relación en un rango entre 0,01 mg/L y 20 mg/L de Cr.

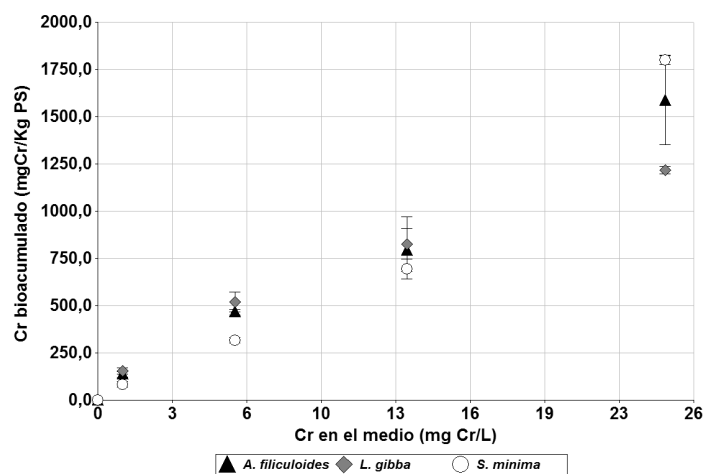


Figura 2.4: Regresión lineal entre la concentración de cromo bioacumulado en función del cromo en solución para: (\diamond) *Lemna gibba* ($r^2=0.92$; p-valor $<0,0001$), (\triangle) *Azolla filiculoides* ($r^2= 0,92$, p-valor $<0,0001$) y (\circ) *Salvinia minima* ($r^2=0,97$; p-valor $<0,0001$). Las barras de error representan el EEM (n=3).

El Factor de Bioconcentración (FBC) es un parámetro útil para evaluar el potencial de las plantas para la acumulación de metales. En este estudio, este factor dependió de los diferentes niveles de cromo en solución (Figura 2.5).

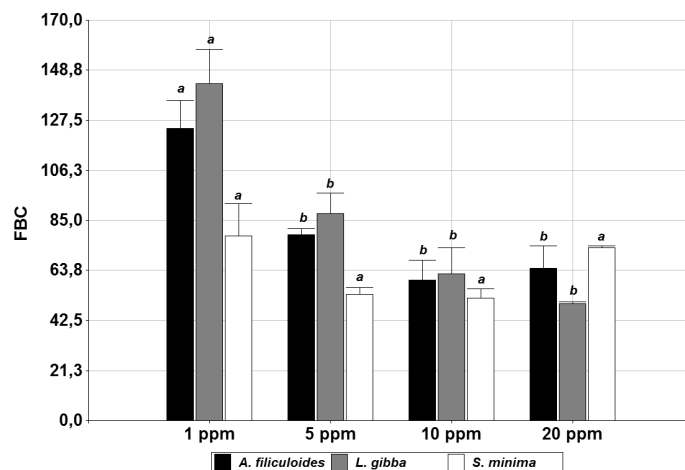


Figura 2.5: FBC para cada especie en los diferentes tratamientos. Las barras de error al EEM (n=3). Medias con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

El decrecimiento del FBC con el aumento de cromo en el medio también fue reportado por otros autores (Diwan et al., 2010; Zayed et al., 1998) para cromo en *Lemna gibba* y en *Brassica juncea*, respectivamente. Los mayores factores de bioconcentración se obtuvieron para la menor concentración de cromo en solución para las tres especies. Tanto *Lemna gibba* como *Azolla filiculoides* presentaron diferencias significativas (p-valor=0,0006 y p-valor=0,0028, respectivamente) entre los tratamientos mientras que en *Salvinia minima* estas diferencias no fueron significativas (p-valor>0,050) para ninguno de los 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 et al., 2001). El máximo valor de FBC (144,3) fue hallado en *Lemna gibba* y corresponde al tratamiento de menor concentración (1 mg Cr/L). Ater et al. (2006) reportaron valores mayores de FBC para la misma especie: 212 y 171 para tratamientos de 5 mg Cr/L y 10 mg Cr/L respectivamente. Los FBC obtenidos en este estudio estuvieron en un rango entre 50-144 para *Lemna gibba*, 65-125 para *Azolla filiculoides* y 73-79 para *Salvinia minima*.

Se verificó la hipótesis enunciada ya que las plantas no solo toleraron en un amplio rango de concentraciones, también acumularon cromo en sus tejidos. Se seleccionó a *Salvinia minima* para los futuros ensayos ya que presentó un FBC estable en un amplio rango de concentraciones así como tolerancia al metal en todo el rango ensayado.

Capítulo 3

Asimilación de cromo por *Salvinia minima*

3.1. Introducción

El cromo existe en varios estados de oxidación, pero las formas más comunes y estables en las que se encuentra son el cromo trivalente y hexavalente (Bhalerao and Sharma, 2015). Su toxicidad varía según su especiación siendo el cromo (VI) mucho más tóxico que el cromo (III), para exposiciones tanto agudas como crónicas (ATDSR, 2012).

A pesar de que puede tener su origen a partir de fuentes geoquímicas, la mayor parte de la contaminación ambiental se debe a fuentes antropogénicas, tales como lechos de minas, efluentes industriales (curtiembres, galvanoplastias), o de los lixiviados de vertedero (Zurayk et al., 2001).

Un informe elaborado en la Argentina (Autoridad de la Cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR), 2012) relevó un total de 18.630 industrias localizadas en la Cuenca Matanza Riachuelo (CMR) de las cuales 1570 fueron declaradas como agentes contaminantes y al menos el 3% de estas industrias vierten cromo en sus efluentes. En muchos casos este vertido es sin tratamiento previo constituyendo uno de los principales problemas de contaminación de la cuenca.

Existen varios métodos para eliminar metales tóxicos del agua: intercambio iónico, ósmosis inversa, electrólisis, precipitación y adsorción. Sin embargo, los métodos presentan eficiencias diferentes para diferentes metales y pueden ser muy costosos, especialmente si se requieren volúmenes grandes, baja concentración de metales y altos niveles de limpieza (Miretzky et al., 2004). En las últimas décadas apareció la fitotecnología como una alternativa efectiva para la eliminación de metales del agua compitiendo con otros tratamientos secundarios.

Existen dos mecanismos generales asociados con la eliminación de metales disueltos en agua usando plantas acuáticas. El primero es una reacción superficial de adsorción rápida (en pocos minutos) que se modela como un proceso de difusión y termina cuando los iones metálicos solubles se unen o adsorben a la pared celular externa de la biomasa. El segundo, depende de la entrada del metal en el metabolismo de la planta y se modela como un proceso de transferencia de masa desde la pared celular externa a la célula o interior de la pared celular. La velocidad con la que ocurre este último mecanismo se puede calcular aproximándolo a una cinética de primer orden (Espinoza-Quñones et al., 2008; Miretzky et al., 2004; Rakhshae et al., 2006). Esta va a estar dada por la Ecuación 3.1:

$$-\frac{\partial[C]}{\partial t} = k[C] \quad (3.1)$$

Donde $[C]$ es la concentración del metal (mg/L), y (k) la tasa constante de adsorción de primer orden (1/día).

Integrando la Ec. 3.1 entre los límites $t = 0$ a $t = t$ y $C_0 = 0$ a $C = C_t$ queda la ecuación 3.2:

$$\frac{[C_t]}{[C_0]} = e^{(-kt)} \quad (3.2)$$

Donde $[C_0]$ es la concentración inicial del metal (mg/L), $[C_t]$ es la cantidad de metal remanente a tiempo t (mg/L) y cuya solución gráfica es:

$$\ln [C_t] = \ln [C_0] - kt \quad (3.3)$$

Donde la intersección con la ordenada es la concentración inicial del metal, $\ln [C_0]$, y la pendiente es k (1/día).

En este capítulo se estudiará la dinámica de remoción de cromo con *S. minima* a lo largo de 8 días, expuesta a 5 mg Cr/L. Se seleccionó esta especie ya que presentó un FBC estable en un amplio rango de concentraciones así como tolerancia al metal en todo el rango ensayado. Dichas características brindan cierta versatilidad por parte de la especie a tolerar diferentes situaciones de estrés.

3.2. Objetivo Específico e Hipótesis

Objetivo Específico:

1. Estudiar la dinámica de remoción de cromo, determinar la capacidad de bioconcentración y la tasa de absorción de *Salvinia minima* durante un periodo de ocho días.

Hipótesis:

1. A una misma concentración, la tasa de asimilación del metal será máxima en los primeros días del ensayo pero irá disminuyendo con el transcurso del tiempo.
2. Existe un nivel de cromo en tejido a partir del cual la planta no sigue acumulando metal.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Diseño Experimental

El bioensayo consistió en la exposición de *Salvinia minima* durante 8 días en agua de la laguna de San Vicente adicionada con 5 mg/L de Cr (VI) bajo condiciones controladas de temperatura e iluminación (fotoperiodo 14:10/luz:oscuridad, temperatura $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 1054 lux) por triplicado (n=3). Las plantas fueron colectadas de la laguna de San Vicente y aclimatadas a condiciones de laboratorio en

el agua del sitio durante la semana previa al ensayo. La caracterización del agua se muestra en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Caracterización del agua de la laguna de San Vicente. En la tabla se indican el promedio y el Error Estándar Medio correspondiente para cada parámetro (n=3). ND: No Detectable

Parámetro	Unidades	Concentración
Sulfatos	mg/L	<10
Sulfuros	mg/L	<0,03
SST	mg/L	5,7±0,9
CDT	mg/L	43,4±0,9
CID	mg/L	18,2±0,5
COD	mg/L	25,2±0,5
Alcalinidad	mg/L	134±1
P-PO ₄ ³⁻	mg/L	<0,1
Fósforo Total	mg/L	<0,5
Cloruros	mg/L	14,9±0,3
N-NO ₃ ⁻	mg/L	<0,3
N-NH ₄	mg/L	0,60±0,06
DQO	mg/L	64,7±1,9
Dureza	mgCaCO ₃ /L	60,8±8,9
Sodio	mg/L	15,2±1,5
Potasio	mg/L	11,8±0,6
Calcio	mg/L	0,10±0,01
Magnesio	mg/L	14,7±2,2
Cobre	mg/L	0,10±0,01
Cinc	mg/L	0,04±0,02
Manganeso	mg/L	0,20±0,04
Hierro	mg/L	0,05±0,01
Cromo	mg/L	ND

Se realizaron dos tratamientos: uno sin plantas (A) y otro con plantas (B). Los recipientes utilizados fueron bateas de plástico de 40 cm x 60 cm x 10 cm. El volumen total en cada unidad experimental fue de 12 litros y la cantidad de biomasa colocada fue de 250±1 g de peso fresco. Ambos tratamientos recibieron una cantidad de líquido proveniente del primer enjuague de la cuba electrolítica de una galvanoplastia (21 g Cr (VI)/L) de manera que la concentración final fuese de 5 mg/L de Cr (VI) (Figura 3.1). Las diluciones se realizaron con el agua de la laguna.



Figura 3.1: Imagen del diseño experimental empleado. Un tratamiento sin plantas y otro con plantas. Ambos por triplicado

Se realizaron mediciones en cada replica de: pH, Temperatura, Conductividad Eléctrica (CE), Oxígeno Disuelto (OD), Potencial Óxido-Reducción (ORP), Cr (VI), Cromo total (Cr T) y Cromo Disuelto (Cr D) en la fase acuosa y Cr T en el tejido a los 0, 1, 2, 4, 7 y 8 días de comenzada la experiencia.

3.3.2. Determinaciones analíticas

La caracterización fisicoquímica del agua de la laguna se realizó por triplicado siguiendo protocolos estandarizados (APHA, 1998) (Capítulo 1), incluyendo: temperatura, conductividad eléctrica (CE), potencial de óxido-reducción (ORP), oxígeno disuelto (OD), amonio, nitratos, ortofosfatos, fósforo total, carbono orgánico disuelto (COD), carbono inorgánico disuelto (CID), Carbono Disuelto Total (CDT), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Alcalinidad, Dureza, Sólidos Suspendedos Totales (SST), sulfuros, sulfatos, cloruros, sodio, potasio, magnesio, calcio, cobre y cinc. También se determinó cromo total (Cr T) en agua y tejido (Sección 1.2.1 y 1.2.3, respectivamente), cromo (VI) y cromo disuelto (Cr D). La fracción de Cromo particulado (Cr P) se calculó como la diferencia entre Cr T y Cr D.

3.3.3. Análisis estadístico

Los resultados fueron representados por los valores medios de las determinaciones y su Error Estándar Medio (EEM). Las diferencias en las concentraciones de cromo obtenidas al inicio y finalización de la experiencia, fueron examinadas mediante ANOVA de un factor. Las variables fueron testeadas para homogeneidad de varianzas usando el test de Levene y Normalidad usando la prueba de Shapiro-Wilks. Cuando se hallaron diferencias significativas entre tratamientos, se realizaron comparaciones con el test de Tukey. Además se realizó una regresión lineal entre el logaritmo natural de la concentración de cromo en la solución en función del tiempo. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando Infostat versión 2016 (Di Rienzo et al., 2016). Se consideraron diferencias significativas a $p < 0,05$.

3.4. Resultados y Discusión

3.4.1. Bioensayo

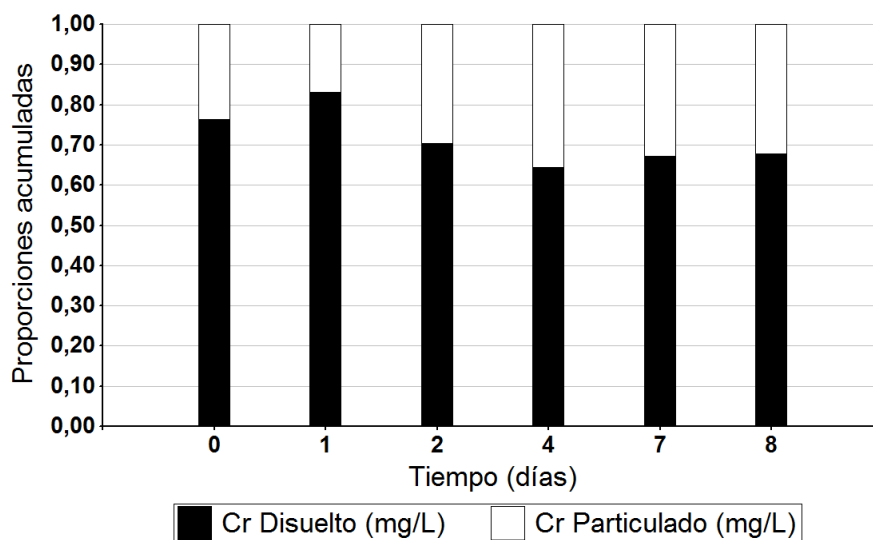
Análisis químico del agua

Durante el ensayo, las mayores pérdidas de agua ocurrieron en los tratamientos con plantas debido a la evapotranspiración, por lo que fueron tenidas en cuenta para las estimaciones subsiguientes. El pH incrementó a lo largo de la experiencia de $7,37 \pm 0,02$ al inicio a $8,34 \pm 0,12$ y $8,41 \pm 0,01$ para el tratamiento sin plantas (A) y el tratamiento con plantas (B) respectivamente. Este incremento puede deberse a procesos microbianos, como la reducción de manganeso, hierro y compuestos de azufre, los cuales pueden aumentar el pH contrarrestando el efecto de la formación del CO_2 , producto de la descomposición de la materia orgánica (Bastviken et al., 2003). Los valores medios de CE estuvieron entre 264 ± 4 - 407 ± 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 231 ± 2 - 364 ± 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ para los tratamientos A y B respectivamente. Se observó una caída del OD asociado a la baja fotosíntesis de fitoplancton, y a la simultánea descomposición del material senescente. Este proceso estuvo acompañado por la disminución del ORP (Tabla 3.2) convirtiéndose en un ambiente reductor al finalizar la experiencia. Sin embargo, la forma de cromo predominante durante todo el ensayo fue Cr(VI) .

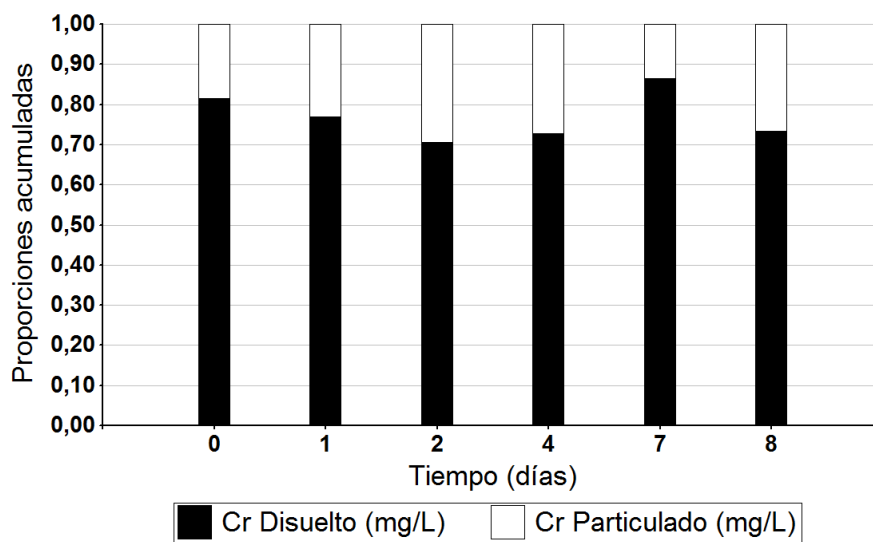
Tabla 3.2: Parámetros medidos en cada unidad experimental a lo largo de la experiencia en tratamiento sin plantas (A) y con plantas (B). Se informa el rango en el que se mantuvieron a lo largo de la experiencia.

Variable (unidad)	A (sin plantas)	B (con plantas)
pH	7,35-8,34	7,40-8,41
CE ($\mu S/cm$)	264-407	231-364
OD (mg/L)	7,37-4,17	7,59-4,80
ORP (mV)	338-213	335-220
Temperatura ($^{\circ}C$)	23,8-22,8	23,3-22,9

El pH y las condiciones redox del ensayo fueron propicias para que la especie de cromo mayoritario sea el CrO_4^{2-} aunque también parte estuvo como particulado ($Cr(OH)_3$) (Figura 3.2) Apéndice B.1.



(a) Sin plantas



(b) Con plantas

Figura 3.2: Proporción del cromo en la fase disuelta y particulada a lo largo de la experiencia para: (a) Tratamiento A (sin plantas) y (b) Tratamiento B (con plantas).

(Palmer and Puis, 1994) afirman que el cromo puede existir en varios estados de oxidación que van desde 0 a 6. En condiciones reductoras, Cr (III) es el estado de oxidación más estable termodinámicamente. Sin embargo, el Cr (VI) puede permanecer estable durante largos períodos de tiempo. Pudiendo explicarse de esta manera que aún en condiciones reductoras al finalizar el ensayo la especie que predomine sea el Cr (VI). Estos autores, han determinado que existen especies diferentes de Cr (III) con respecto al pH. Cr (III) predomina como especie iónica (es decir, Cr^{3+}) a valores de pH menores a 3. A valores de pH por encima de 3,5 se hidroliza en: CrOH^{2+} , $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$, y $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$. El $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$ es la única especie sólida. Este es el principal producto precipitado en el proceso de reducción de Cr (VI) a Cr (III) y sería el componente mayoritario del cromo particulado en el ensayo realizado (Figura 3.3).

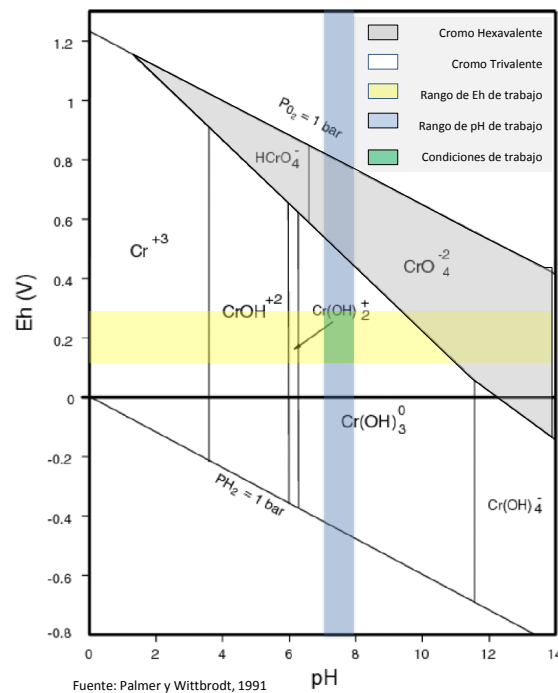


Figura 3.3: Diagrama de especiación del cromo de acuerdo al pH y el potencial redox (Eh). En gris se representa la zona de las especies de cromo con estado de oxidación (VI), en blanco las especies de cromo con estado oxidación (III), en amarillo y azul se representa el rango de ORP y pH medido durante la experiencia, respectivamente y en verde la zona de ORP y pH a la cual se desarrollo el ensayo.

La concentración de cromo total al finalizar la experiencia fue significativamente menor ($p < 0,05$) en el tratamiento con plantas (Figura 3.4) indicando un efecto significativo de las plantas en la remoción del cromo.

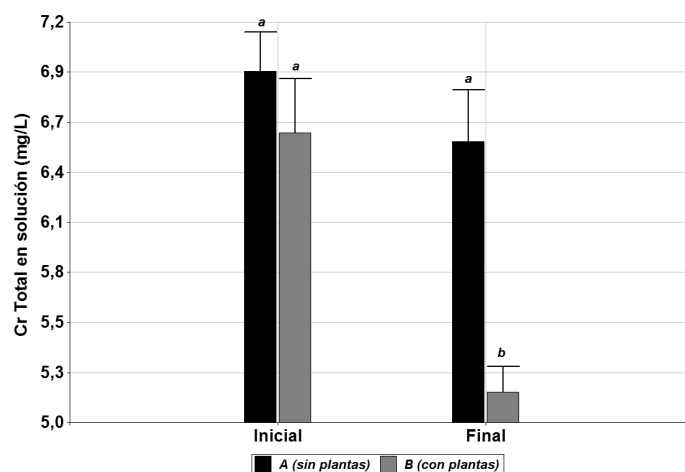


Figura 3.4: Concentración de cromo total inicial y final para el tratamiento A (sin plantas) y el tratamiento B (con plantas). Las barras de error corresponden al Error Estándar Medio (EEM) (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas (p-valor<0,05)

Al analizar el tratamiento con plantas, se observa que la concentración de cromo total de la solución en función del tiempo decae a medida que la concentración de cromo en el tejido incrementa evidenciando la incorporación del metal a la biomasa (Figura 3.5).

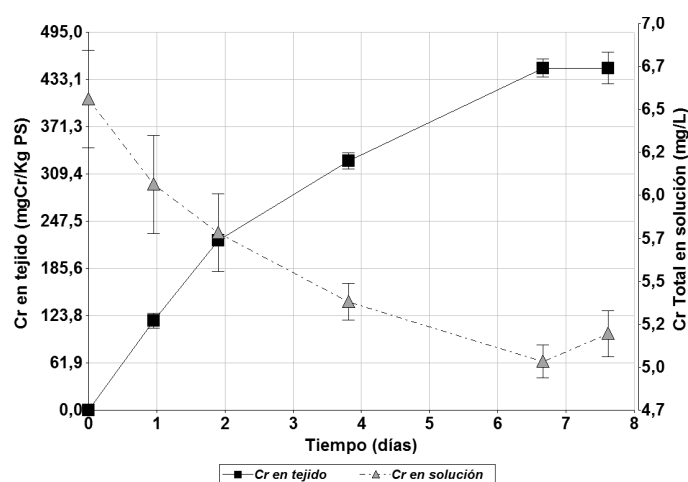


Figura 3.5: Análisis del cromo en solución (Δ) y en tejido (\square) para el tratamiento con plantas (B) en función del tiempo. Las barras de error corresponden al EEM (n=3).

Cromo en tejido vegetal

El cromo en el tejido incrementó a medida que transcurrió la experiencia hasta alcanzar la máxima acumulación y saturación al séptimo día ($448,1 \pm 40,4$ mg Cr/Kg biomasa) (Figura 3.5). Este valor fue menor al reportado para esta misma especie por la bibliografía (3111 mg Cr/Kg biomasa) (Olguín et al., 2002). Estos autores trabajaron a un pH de 3 donde la especie de cromo predominante era el Cr(III). El estado de oxidación del cromo influye fuertemente en la tasa de absorción del mismo ya que Cr(VI) puede cruzar fácilmente las membranas celulares (Riedel, 1988), además de que el transportador de membrana sulfato-fosfato también puede transportar aniones cromato (Chandra and Kulshreshtha, 2004). Por otro lado, el Cr (III) no utiliza ningún transportador de membrana específico, por lo que entra en la célula a través de la difusión simple siempre y cuando forme complejos con ligandos lipófilos apropiados (Gauglhofer et al., 1991).

El FBC (Factor de Bioconcentración) se utiliza como una medida de la eficiencia de acumulación de metales pesados en plantas. El máximo valor del FBC se registró al séptimo día ($65,8 \pm 0,4$) sin diferencias significativas con respecto al del octavo día ($61,6 \pm 3,9$) (Figura 3.6). Este valor de FBC es consistente con el hallado por Prado et al. (2010) donde trabajaron con la misma especie y concentración (49 ± 3).

Valores de FBC superiores a 1, como los encontrados para *Salvinia minima* en este trabajo, indican que la especie es una potencial remediadora de ambientes contaminados por cromo (Zhang et al., 2002).

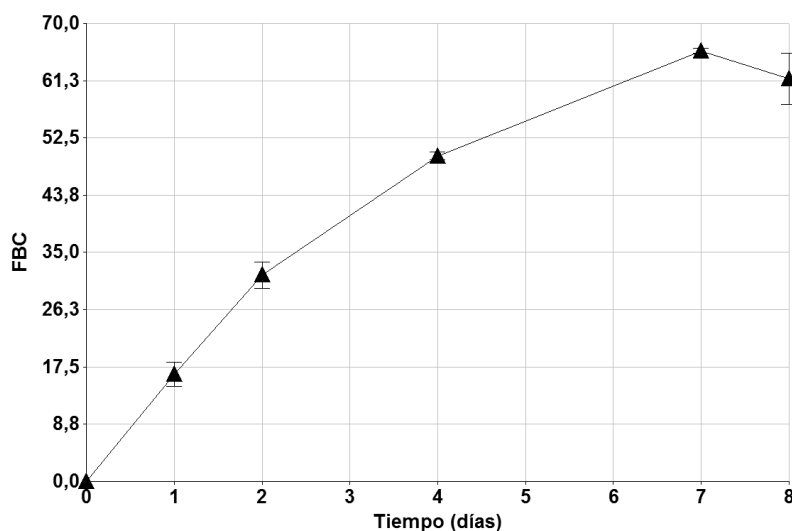


Figura 3.6: Factor de Bioconcentración (FBC) en función del tiempo. Las barras de error corresponden al EEM ($n=3$).

La tasa de asimilación fue máxima a las 24 hs ($117,2 \pm 9,7$ mg Cr Kg⁻¹día⁻¹) y fue disminuyendo en el transcurso de la experiencia (Figura 3.7). La máxima incorporación del metal ocurrió en las primeras horas y luego fue decayendo hasta alcanzar niveles de cromo a partir de los cuales las plantas no siguieron acumulando, pudiendo asociarse a niveles tóxicos de cromo para esta especie.

Prado et al. (2010) obtuvieron una tasa de asimilación de $40,5$ mg Cr Kg⁻¹día⁻¹ al sexto día de tratamiento trabajando con la misma especie y concentración la cual es comparable con la tasa de asimilación obtenida en este trabajo para el séptimo día de exposición ($64,0 \pm 2,9$ mg Cr Kg⁻¹día⁻¹).

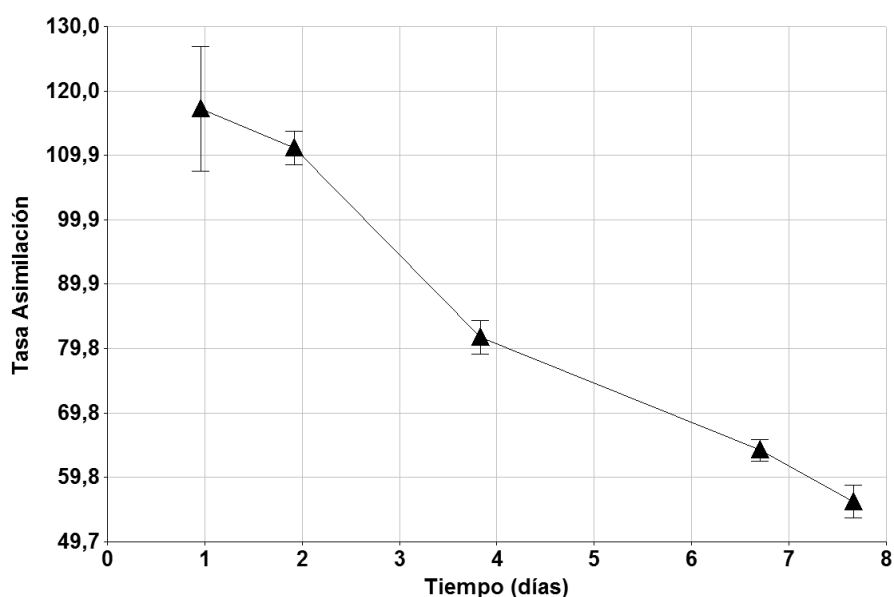


Figura 3.7: Tasa de asimilación de *Salvinia minima* para el cromo. Las barras de error corresponden al EEM (n=3).

Por otro lado, el comportamiento de la remoción del cromo ajusta a una cinética de primer orden (Figura 3.8).

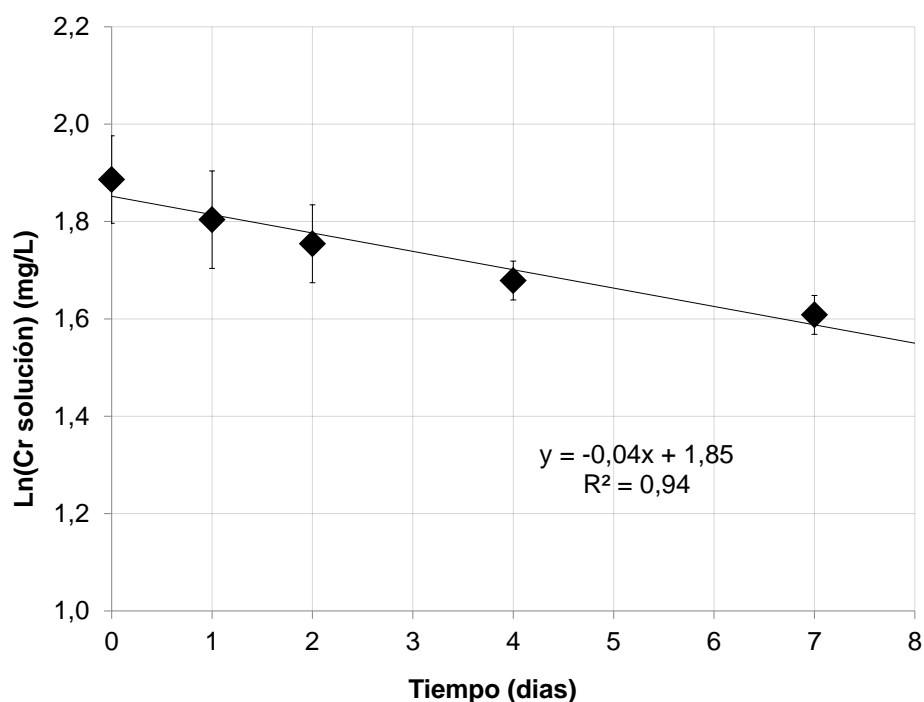


Figura 3.8: Logaritmo natural de la concentración de cromo en función del tiempo. Ajuste a una ecuación cinética de primer orden con $k = 0,04 \text{ día}^{-1}$ y $r^2 = 0,94$ (p-valor $< 0,05$). Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95 % ($n=3$).

Lo cual implica que la velocidad de asimilación depende de la concentración de cromo presente en el medio acuoso y de la biomasa empleada. El coeficiente de velocidad obtenido, k , fue de 0.04 día^{-1} .

Se verificaron las hipótesis propuestas donde se observó una tasa de asimilación máxima en las primeras horas del ensayo y donde pasado un nivel de cromo ($448,1 \pm 40,4 \text{ mg Cr/Kg PS}$) en el tejido, la planta deja de acumular metal.

Capítulo 4

Descomposición de *Salvinia minima* con cromo acumulado

4.1. Introducción

El concepto de fitorremediación ha despertado considerable interés por ser un mecanismo económicamente viable y ambientalmente sustentable de acumulación de metales pesados por medio de plantas. Sin embargo, cuando los tejidos empiezan a descomponerse y pueden actuar como una fuente de metal cuando la actividad microbiana los moviliza (Du Laing et al., 2006) volviendo de esta manera al medio del cual fueron removidos. La descomposición es el proceso por el cual la materia orgánica se cataboliza en sus formas inorgánicas constitutivas (por ejemplo, CO_2 , NH_4 , PO_4^{3-} , etc) o es incorporada a la biomasa viva (por ejemplo al ser asimilada por bacterias o invertebrados) (Boulton and Boon, 1991). En particular, la velocidad de descomposición del detrito en agua está influenciada por una serie de condiciones ambientales, incluyendo la temperatura y el pH del agua, la composición del sustrato, la velocidad de la corriente y las concentraciones de oxígeno y nutrientes disueltos. Para permitir la comparación de los resultados con otros estudios, es importante prestar atención a la medición de estas variables durante el curso del experimento e intentar evaluar su influencia en las tasas de descomposición (Boulton and Boon, 1991).

Un método para abordar el estudio de estos procesos es el de “*litter bag*”. Esta técnica consiste en colocar el material vegetal, previamente secado a 70°C , en bolsas plásticas con malla entre 0,2 y 10 mm según el objetivo del ensayo. El tamaño de la malla es clave ya que condiciona el acceso de los consumidores al detrito. Varios estudios se han centrado en la acumulación de metales en la descomposición del detrito de plantas acuáticas a lo largo del tiempo utilizando el método de “*litter bag*” (Deng et al., 2016; Du Laing et al., 2006).

A pesar de que presenta varios inconvenientes (Ewel, 1976; St. John, 1980; Wiegert and Evans, 1964; Witkamp and Crossley Jr, 1966), el método “*litter bag*”, sigue siendo la técnica más comúnmente utilizada para examinar la descomposición del detrito. Aunque puede subestimar la descomposición real, los resultados reflejan las tendencias características del material a descomponer en ese sitio y, como tal, permitirá comparaciones entre especies, sitios y manipulaciones experimentales (Wieder and Lang, 1982).

Hasta la fecha, los estudios sobre la acumulación / liberación de metales durante la descomposición de plantas acuáticas se han centrado principalmente en plantas emergentes arraigadas (por ejemplo, *Typha domingensis*, *Spartina alterniflora* y *Phragmites australis*) (Deng et al., 2016). Recientemente, Deng et al. (2016), han informado sobre la descomposición de macrófitas sumergidas pero no hay trabajos que traten sobre la descomposición de macrófitas flotantes.

En este capítulo, se describirá el desarrollo de la experiencia llevada a cabo empleando el método de “*litter bag*” que permitirá conocer los procesos que dominan la descomposición y consecuente liberación del cromo para la especie de macrófita flotante *Salvinia minima*.

4.2. Objetivos Específicos e Hipótesis

Objetivos Específicos:

1. Estudiar la descomposición de *Savinia minima* con cromo acumulado.
2. Determinar la variación del metal en el tejido a través del tiempo simulando un ambiente natural mediante el empleo de un mesocosmos.
3. Conocer las variables físico-químicas que operan en el proceso de descomposición.
4. Determinar la dinámica de liberación-adsorción de cromo en función del tiempo de descomposición.

Hipótesis:

1. Durante el proceso de descomposición parte del cromo retenido en el material vegetal será liberado al medio.
2. El cromo liberado al medio quedará retenido en los sedimentos.

4.3. Materiales y Métodos

La experiencia se llevó a cabo en un mesocosmos cilíndrico de 200 litros (60 cm de diámetro y 90 cm de altura) (Figura 4.1) con agua del acuífero Puelche. La misma se dejó colonizar por diferentes organismos. Para ello, fue inoculada con agua de la laguna de tratamiento de líquidos cloacales del Instituto Nacional del Agua (INA) y fueron colocados algunos peces pequeños como *Cnesterodon decemmaculatus*. Al cabo de un año se realizó la caracterización biológica la cual consistió en identificar las diferentes familias de organismos presentes. La muestra de fitoplancton fue colectada filtrando 10 L del agua por una red de 30 μm y preservada con formol al 4%. La observación se realizó en microscopio invertido marca Hydro Bios utilizando una cubeta de 5 ml. El zooplacton se colectó filtrando 10 L de agua por una red de 45 μm y preservó con formol al 4%. La observación se realizó en Lupa marca Zeiss.



Figura 4.1: Vista lateral y superior del recipiente cilíndrico de 200 L de capacidad utilizado como mesocosmos para el desarrollo de la experiencia. La superficie se encontraba cubierta por macrófitas acuáticas

La superficie del mesocosmos se encontraba totalmente cubierta por plantas acuáticas de la especie *Salvinia minima* la cual ejercía un control sobre el desarrollo del fitoplancton. El ensayo se desarrolló a la intemperie sin protección de la lluvia. Se incubó alrededor de 1 gramo de peso seco de las plantas de *Salvinia minima* expuestas durante 8 días a una solución de 5 mg/L de cromo (Capítulo 3). Previamente fueron secadas en estufa a 70°C hasta peso constante y colocadas en bolsas plásticas de 10 x 15 cm y de malla 2 mm (Figura 4.2).

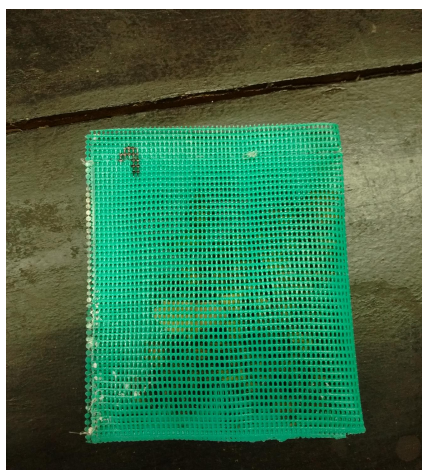


Figura 4.2: Bolsa plástica utilizada para la descomposición. Tamaño: 10 x 15 cm y malla de 2 mm

Las bolsas fueron identificadas y sumergidas colocando un peso de manera tal

que estas quedasen en el fondo del mesocosmos de forma vertical (Figura 4.3). Los tratamientos se realizaron por triplicado. Las remociones se realizaron a los: 1, 4, 7, 29, 183, 239 y 270 días de comenzada la experiencia la cual comprendió 9 meses y las cuatro estaciones del año.



Figura 4.3: Dispositivo utilizado para que las bolsas quedasen sumergidas de forma vertical

A medida que fueron removidas se procedió de la siguiente manera: se secó el contenido de las bolsas a 70°C hasta peso constante, se pesó y se determinaron las concentraciones de cromo en el material vegetal (Capítulo 1). A lo largo de toda la experiencia se monitoreó el pH, oxígeno disuelto, potencial redox, conductividad eléctrica y temperatura del agua del mesocosmos. Se determinó el cromo presente en el agua (Sección 1.2.1), sedimento (Sección 1.2.2) y plantas (Sección 1.2.3) presentes en el mesocosmos al finalizar la experiencia.

4.3.1. Análisis de Datos

El índice de acumulación (IA) se calcula para indicar la liberación o acumulación neta de metales durante la descomposición (Romero et al., 2005) (Ec. 4.8).

$$IA = \frac{W_t X_t}{W_0 X_0} \quad (4.1)$$

Donde W_t (g) es la masa seca del material vegetal en el momento t , X_t (mg/kg) es la concentración de metal 'X' en el detrito en el momento t , W_0 (g) es el peso

seco inicial del material vegetal y X_0 (mg/Kg) es la concentración inicial de metal 'X' en el detrito. Un valor IA de 1 indica que el material vegetal descompuesto en el tiempo t contenía la misma masa del metal 'X' que cuando el tejido de *S. minima* se colocó en la bolsa de descomposición; IA <1 indica una liberación neta de metal 'X' desde el detrito en descomposición de *S. minima*; mientras que IA >1 indica una acumulación neta de metal 'X' en el detrito en descomposición.

4.3.2. Análisis Estadístico

Los resultados fueron representados por los valores medios de las determinaciones y su Error Estándar Medio (EEM). Los datos de cromo remanente en el tejido fueron ajustados a una función exponencial. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando Infostat versión 2016 (Di Rienzo et al., 2016). Se consideraron diferencias significativas a $p < 0,05$.

4.4. Resultados y Discusión

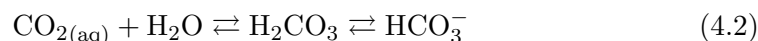
4.4.1. Caracterización Biológica

Tanto el fitoplancton como el zooplancton se encontraba representado por las siguientes familias de organismos: euglenofita, bacilariofita, clorofitas charofitas, ciliados, flagelados, rotíferos, copépodos y cladóceros. Dentro de las macrófitas flotantes, se encontraron ejemplares de *Spirodela intermedia* y *Salvinia minima*. También había gasterópodos de la especie *Pomacea canaliculata* y peces como *Cnesterodon decemmaculatus*. Puede observarse que muchos de los eslabones tróficos se encontraban representados en el mesocosmos. La caracterización solo se realizó al finalizar la experiencia con lo cual, hay que contemplar que esta descripción del sistema solo es una foto de las condiciones finales. Las grandes oscilaciones que hubieron en los parámetros físico-químicos seguramente trajo aparejado fluctuaciones en cuanto a la composición y biodiversidad de los organismos presentes en el sistema.

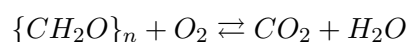
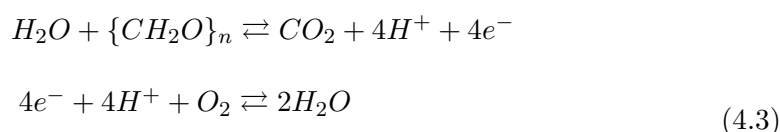
4.4.2. Variaciones físico-químicas

Durante la experiencia se observaron marcadas variaciones de los parámetros físico-químicos evaluados (Figura 4.4). El pH disminuyó progresivamente hasta alcanzar valores levemente ácidos (6,89) a los 59 días de haberse puesto a descomponer el material. Valiela (1984) ha descrito la pérdida de peso de la materia orgánica por descomposición en tres etapas principales, y con velocidades de descomposición decrecientes, y a las que llamó fase de lixiviación, fase de descomposición y fase refractaria, respectivamente. En la fase de lixiviación, que se produce en las primeras semanas, el mecanismo dominante es la rápida lixiviación de los materia-

les solubles. En esta etapa, el CO_2 producido por la descomposición de la materia orgánica acidifica el medio (Ec. 4.2).



Al avanzar el proceso de descomposición la oxidación de la materia orgánica produce un consumo del O_2 presente ya que este actúa como aceptor de electrones (Ec. 4.3).



A los 59 días se registró el mínimo valor de OD (0,88 mg/L) y a los 54 días el mínimo de ORP (118 mV). Cuando el oxígeno es limitado, se agota rápidamente y el potencial redox disminuye rápidamente. En este caso, los aceptores de electrones alternativos, como el nitrato y los iones sulfato, tienen un rol fundamental (Stumm and Morgan, 1996). La reducción de estas especies químicas por los procesos microbianos tiende a incrementar el pH, compensando el efecto contrario de la formación de CO_2 (Bastviken et al., 2003). Esto puede observarse en el incremento progresivo del pH hasta valores alcalinos de 9,0 a los 165 días. También se observó un incremento del OD alcanzando valores máximos (7,1 mg/L) en la estación fría y disminuyendo hasta condiciones nuevamente de anoxia en la primavera como consecuencia del aumento de la temperatura que por un lado disminuye la solubilidad del oxígeno y por otro promueve el aumento de las tasas de descomposición por microorganismos. Por otro lado, la conductividad eléctrica evidenció estar afectada por la liberación de los electrolitos propios de la descomposición del material vegetal alcanzando valores máximos durante los primeros 4 meses y luego decayendo abruptamente y manteniéndose constante hasta finalizar la experiencia.

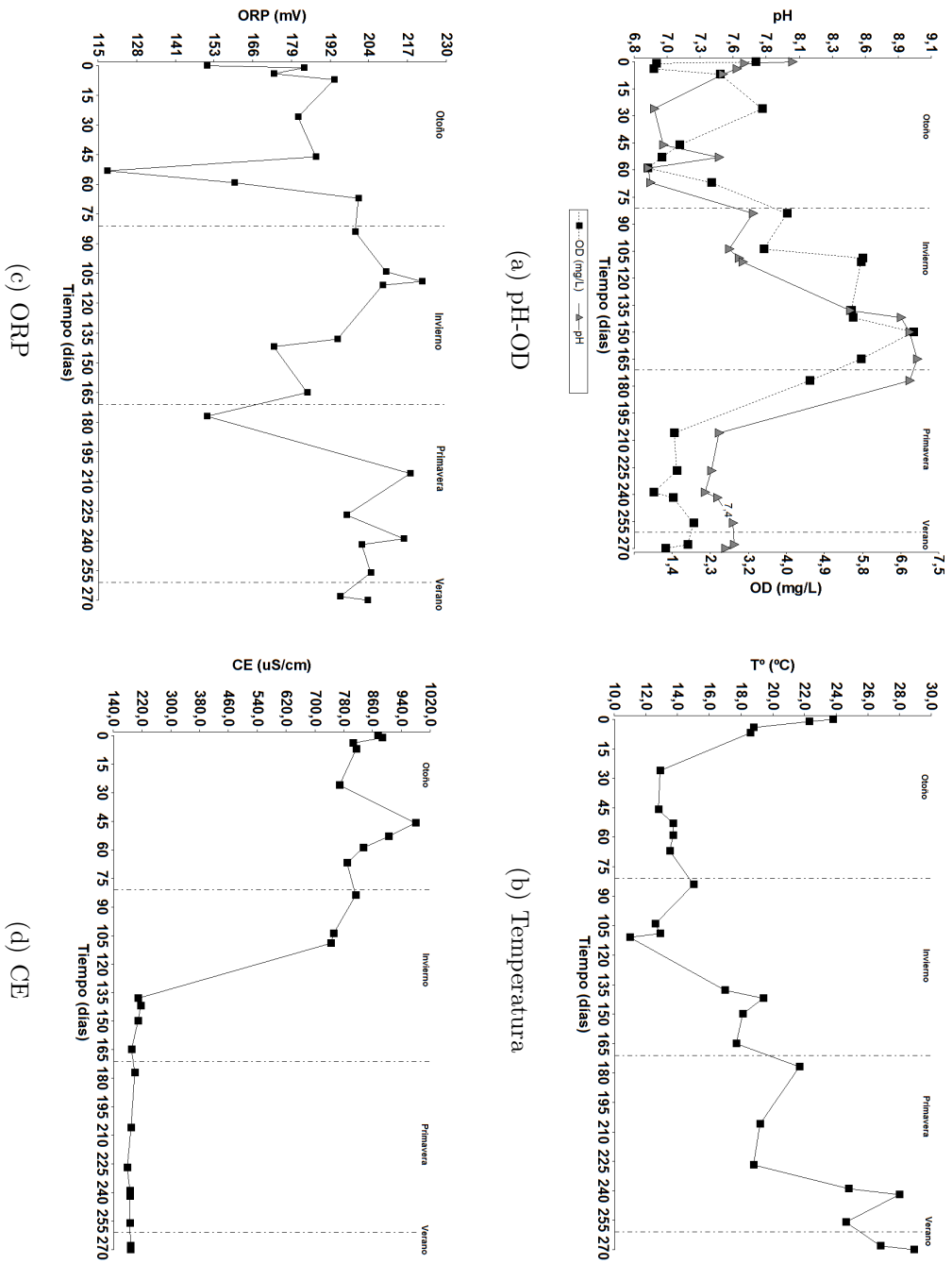


Figura 4.4: Variables físico-químicas en función del tiempo: a) Comportamiento del pH (Δ) y el OD (\square). b) Comportamiento de la temperatura. c) Comportamiento del Potencial de Oxido-Reducción. d) Comportamiento de la Conductividad Eléctrica. Las líneas punteadas separan las diferentes estaciones en la que se desarrolló la experiencia.

4.4.3. Descomposición a través del tiempo: Pérdida de biomasa del detrito

En la Figura 4.5 se presenta la proporción de detrito remanente a lo largo de la experiencia (Apéndice C.1). Se observa que la mayor descomposición se da en los primeros 30 días. Si bien en todas las fases de descomposición operan varios mecanismos que llevan a la pérdida de peso, cada una de ellas está dominada por uno en particular. En la fase de lixiviación, que se produce en las primeras semanas, el mecanismo dominante es la rápida liberación de los materiales solubles, e implica la rápida desaparición de nutrientes para distintas macrófitas. La segunda etapa, que puede durar más de 350 días, está dominada por la degradación microbiana de la materia orgánica con la lixiviación de los productos resultantes. La última etapa, caracterizada por la más baja tasa de decaimiento, corresponde a la lenta degradación de los materiales refractarios (Arreghini, 2008). La segunda etapa puede observarse entre el primer mes y el octavo donde la descomposición es prácticamente nula y empieza a aumentar en conjunto con la llegada de la estación cálida. Siendo la temperatura un factor clave junto con el desarrollo de los microorganismos.

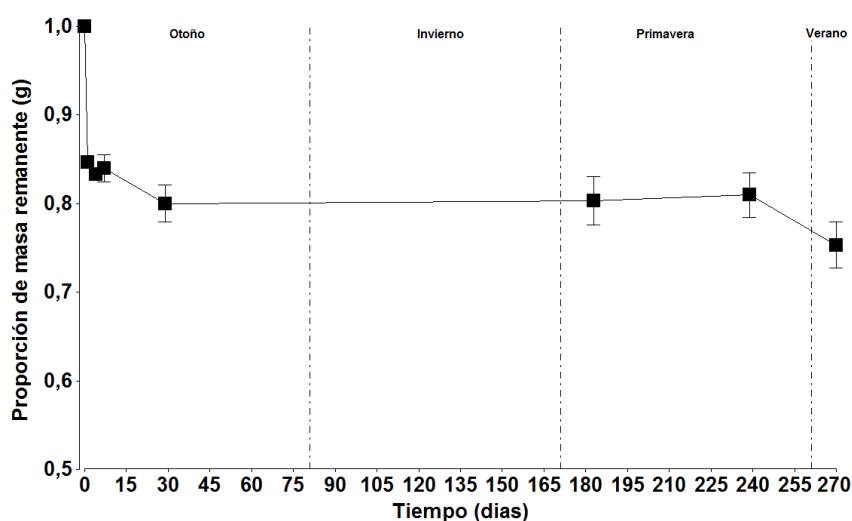


Figura 4.5: Proporción de detrito remanente en función del tiempo. Las líneas punteadas separan las diferentes estaciones en la que se desarrollo la experiencia. Las barras de error representan el EEM (n=3).

4.4.4. Descomposición a través del tiempo: liberación de cromo

El análisis del cromo presente en el tejido vegetal mostró que la máxima liberación ocurrió entre la primer semana y los 20 días posteriores siguiendo un patrón muy similar al del detrito remanente (Figura 4.6). Esta máxima liberación coincide con la fase de lixiviación. Al finalizar esta fase se observó una reducción de aproximadamente el 90 % ($585,9 \pm 12,4$ mg Cr/Kg PS) del cromo bioacumulado y solo un 10 % ($88,3 \pm 8,1$ mg Cr /Kg PS) del cromo quedó retenido en la biomasa remanente.

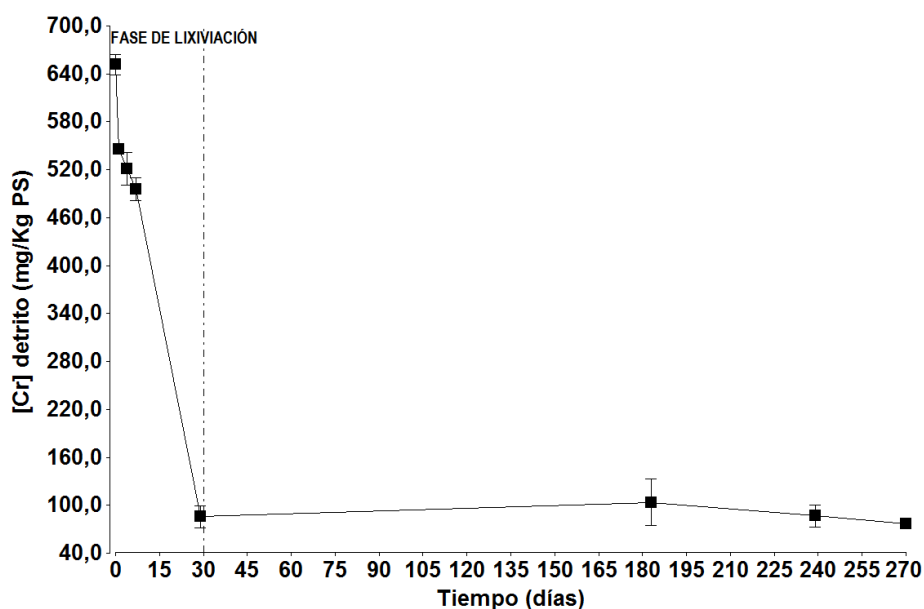


Figura 4.6: Concentración de cromo en el detrito a lo largo de la experiencia. La máxima liberación ocurre en los primeros 30 días. A partir del mes, solo un 10 % del cromo queda retenido en la biomasa refractaria. Las barras de error representan el EEM ($n=3$).

La proporción de cromo remanente en el tejido vegetal fue ajustada a una regresión no lineal de tipo exponencial (Figura 4.7) cuya función fue la siguiente (Ec. 4.4):

$$f(t) = \alpha e^{\beta t} + \gamma \quad (4.4)$$

Donde α es la concentración inicial, β la tasa de decaimiento del metal en el tejido y γ es una constante.

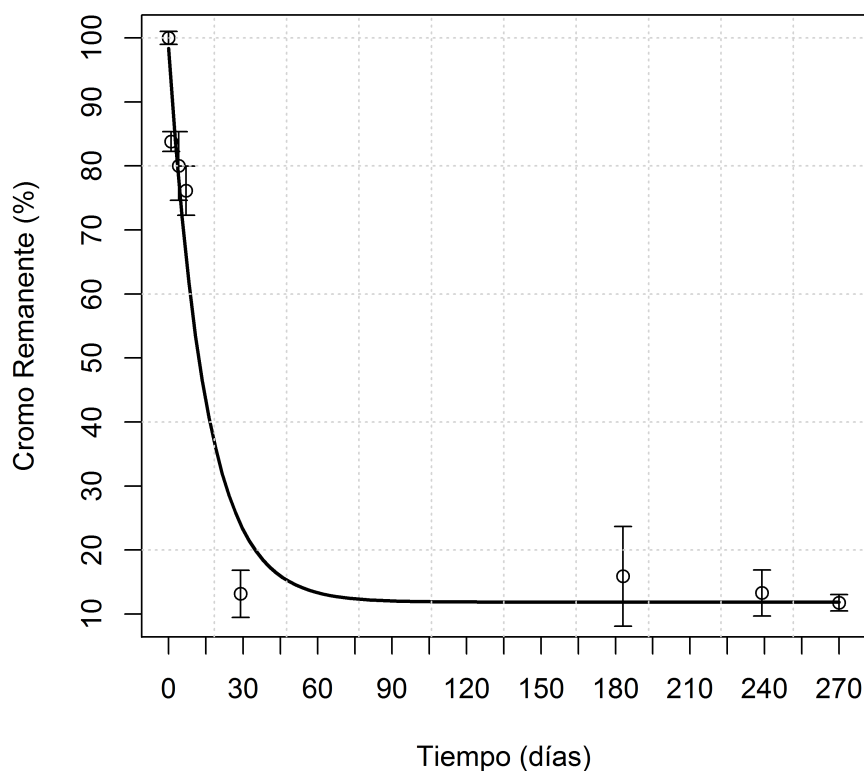


Figura 4.7: Porcentaje de cromo remanente en el tejido en función del tiempo. Los datos fueron ajustados a una regresión no lineal de tipo exponencial. Las barras de error representan el EEM (n=3).

4.4.5. Cambios en el Índice de Acumulación (IA) de cromo durante la descomposición del detrito

La acumulación o liberación del metal durante la descomposición está determinada por dos procesos principales: (1) la liberación de metales desde los tejidos vegetales muertos a medida que se oxidan; y (2) la sorción pasiva en la superficies del detrito y la acumulación activa por colonizadores microbianos (Du Laing et al., 2006; Eid et al., 2012; Schaller et al., 2011; Windham et al., 2004). La primera semana los índices de acumulación se mantuvieron en torno a 1 (0,8-1,1) lo que indica que el cromo no se libera al medio o la proporción que se libera es muy baja. A partir de esta semana, se registraron valores del IA muy inferiores a 1 (0,1-0,2) asociados a la liberación del cromo desde el detrito al medio. El hecho que el IA

se haya mantenido constante hasta finalizar la experiencia, permite inferir que el detrito se estaría comportando como fuente de cromo para el sistema (Figura 4.8).

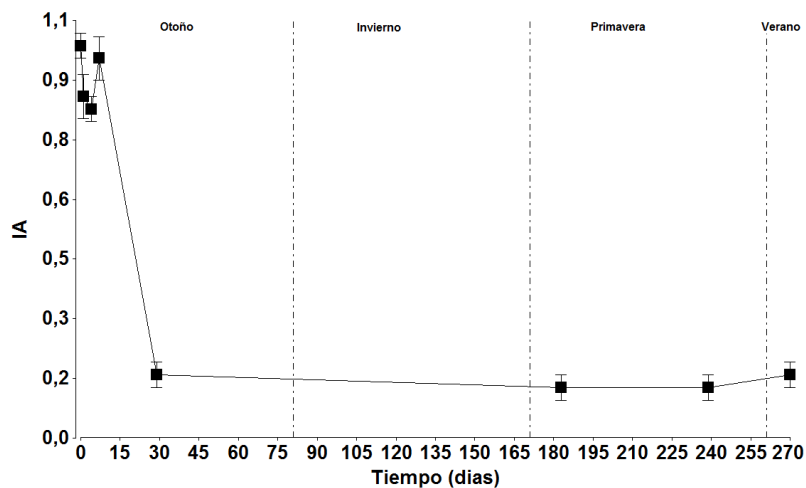


Figura 4.8: Cambios en el índice de acumulación (AI) de cromo en el detrito de *S. minima* durante el experimento de descomposición de 270 días consecutivos. Las líneas punteadas separan las diferentes estaciones en la que se desarrolló la experiencia. Las barras de error representan el EEM ($n=3$).

4.4.6. Análisis del cromo liberado

Se analizaron los distintos extractos presentes en el mesocosmos: agua, sedimento y macrófitas flotantes, donde se creía que podría haber quedado retenido el cromo liberado. Tanto en el agua así como en las plantas de *Salvinia minima* vivas presentes en el sistema, no se encontraron concentraciones de cromo detectables. En cambio, en el sedimento se hallaron concentraciones de $29,17 \text{ mg/kg} \pm 2,17 \text{ mg/kg}$ (media \pm EEM). Estos datos insinuarían que los sedimentos actuarían como trampa del cromo liberado por el detrito en descomposición. A pesar de que el cromo se encontró en concentraciones muy bajas en el agua del mesocosmos, se observó un cierto grado de toxicidad al comparar el aspecto de las plantas del mesocosmos expuesto al detrito contaminado en comparación con las macrófitas de la misma especie presentes en los mesocosmos donde no se colocó material a descomponer (Figura 4.9).



(a) Mesocosmos expuesto al detrito contaminado



(b) Mesocosmos no expuesto al detrito contaminado

Figura 4.9: a) Macrófitas flotantes del mesocosmos donde se realizó el ensayo de descomposición. b) Macrófitas flotantes del mesocosmos que no estuvo expuesto a detrito contaminado.

Se verificaron las hipótesis propuestas donde efectivamente el cromo retenido en los tejidos es liberado al medio y captado por los sedimentos.

Capítulo 5

Conclusiones y Propuestas

El trabajo permitió cumplir los diferentes objetivos y poner a prueba las hipótesis enunciadas. Se verificó la tolerancia al cromo de las especies: *L. gibba*, *A. filiculoides*, *S. minima* aún en un amplio y elevado rango de concentraciones de cromo. Si bien, la tasa de crecimiento relativo fue un buen estimador de la tolerancia, se desprende la necesidad de medir otras variables bioquímicas como: clorofila, proteínas totales o enzimas de estrés oxidativo que complementen y aporten un mayor entendimiento de la viabilidad de la planta frente a esas concentraciones de metal.

Salvinia minima no solo demostró ser tolerante al cromo si no que también se logró confirmar su potencial como acumuladora de cromo ya propuesto por otros autores (Olguín et al., 2002). Se verificó la hipótesis sobre la saturación del tejido con cromo y se determinó cuál era este valor.

Se evidenció que la mayor absorción se da en los primeros días. Al cabo de ocho días se empezó a observar la saturación del cromo en el tejido imposibilitando la toma de metal desde el medio. Esto demuestra la efectividad de esta especie para remover el cromo que se encontraba disuelto en el efluente y concentrarlo en una matriz compacta, de fácil manipulación y disposición.

Por otro lado, se observó que las condiciones del medio son determinantes tanto para la absorción como para la biodisponibilidad del metal evidenciando la necesidad de buscar las condiciones óptimas donde la planta pueda desarrollarse y que a su vez, el cromo se encuentre biodisponible para que esta pueda absorberlo.

El estudio de la descomposición del material vegetal aportó información relevante y se verificó que el tejido en descomposición, entre la primer semana y los 30 días, devuelve al medio el 90 % del cromo retenido. Dicho dato alerta de la necesidad de una pronta cosecha del material vegetal senescente. Una cuestión importante que subyace este hecho es como y donde disponer estas plantas.

A fines de la década del los 90, apareció la fitominería como una alternativa viable para el tratamiento de la biomasa utilizada en la fitorremediación. Esta tecnología consiste en la calcinación de la biomasa de plantas acumuladoras de metales. A la ceniza obtenida se la denomina “bio-mineral”, la cual puede ser procesada para la recuperación de los metales pesados, o, si el metal es de bajo valor, se la puede disponer en un lugar apropiado donde no represente un riesgo para el medio ambiente (Ali et al., 2013; Robinson, 1999).

En este trabajo se conoció el rango de tolerancia de tres especies de las cuales se seleccionó una de ellas y se calculó la tasa de asimilación, la constante cinética k_1 y dinámica de descomposición. Con toda esta información se propone la utilización de *S. minima* para el tratamiento terciario de un efluente con cromo. A continuación se presenta un propuesta de aplicación a un caso hipotético de tratamientos de efluentes.

Para abordar la propuesta se utilizó un modelo de simulación. Estos modelos son representaciones de la realidad que proveen una simplificación y esquematización a una escala espacial y temporal dada. Para realizar esta simplificación se consideró a una laguna como un Reactor Tanque Agitado de Flujo Continuo

(CFSTR, de sus siglas en ingles “continuous-flow stirred tank reactors”). En este tipo de reactores, las concentraciones de reactivos y productos en el flujo de salida son las mismas que las que se encuentran dentro del reactor y son función del tiempo de residencia y de la tasa de reacción. La formula que describe este tipo de modelos esta definida por la Ecuación 5.2.

$$V \frac{\partial [C]}{\partial t} = Q[C]_{entrada} - Q[C]_{salida} + RV \quad (5.1)$$

Cuando $t \rightarrow \infty$ el sistema alcanza el estado estacionario y queda definido por la Ec.5.2.

$$\frac{Q}{V}[C]_{entrada} - \frac{Q}{V}[C]_{salida} + RV = 0 \quad (5.2)$$

Donde V es el volumen del reactor, Q es el caudal de entrada y salida, C la concentración de cromo y R es la velocidad con la que las plantas incorporan al cromo la cual está definida por la reacción cinética de primer orden ($R = -k[C]_{salida}$) desarrollada en el Capitulo 3.

A partir de estas variables, se realizó el dimensionamiento de una laguna de tratamiento para alcanzar el límite de vuelco, establecido por el ADA (Autoridad del Agua) en la resolución 366/2003 para vertido en colector cloacal o cuerpo de agua superficial. Para los cálculos se utilizaron los datos de una curtiembre chica la cual genera $69 \text{ m}^3\text{día}^{-1}$ de efluente con una concentración entre 10-40 mg/L de cromo en el curtido de 1000 pieles diarias. Se tomó como supuesto que con el tratamiento convencional la concentración final del efluente es de 5 mg Cr/L (se realizó esta suposición para ajustar la concentración del efluente a la ensayada en este trabajo). El efluente ingresa a la laguna con 5 mg/L y luego del tratamiento la concentración de salida será de 2 mg/L.

Para obtener este rendimiento las dimensiones de la laguna, obtenida a partir de la Ec. 5.2, tendrá que tener un volumen de 2570 m^3 la cual, con una profundidad 1.5 m, ocupará una superficie de 1713 m^2 (30 x 60 m aproximadamente). Las plantas deberán ser cosechadas y calcinadas con periodicidad. El esquema de trabajo se detalla en la Figura 5.1.

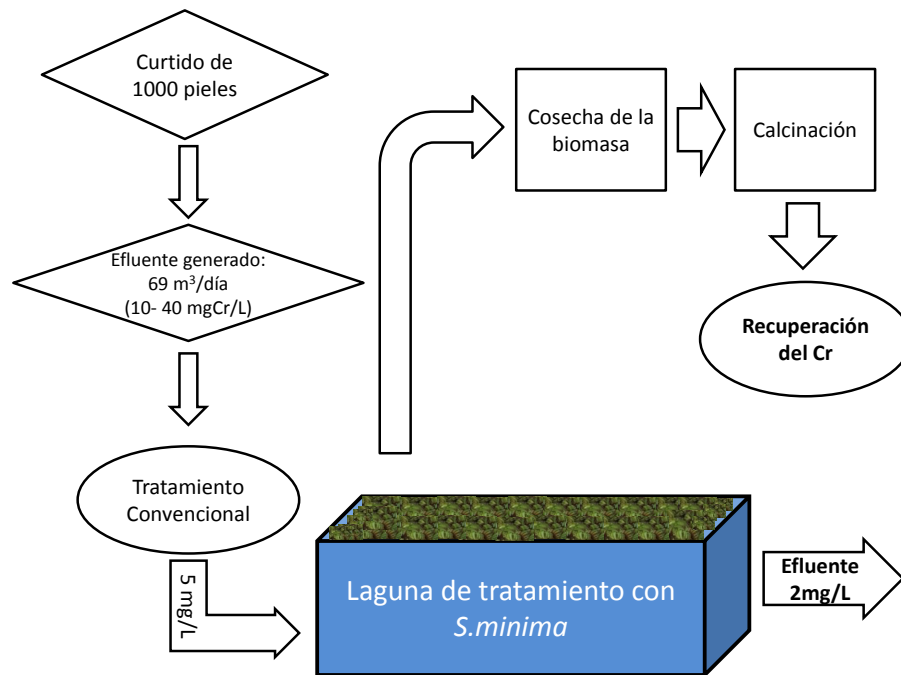


Figura 5.1: Esquema de una laguna de tratamiento modelada como Tanque Reactor de Agitamiento con Flujo Continuo (CTFST).

El uso de humedales presenta limitaciones en cuanto al tratamiento de efluentes con metales pesados como:

- Requiere mucha superficie.
- Aplicable solo a efluentes con niveles bajos a moderados de metal o que sufrieron algún pre-tratamiento previo físico-químico. A su vez, este debe ser enriquecido en nutrientes para permitir el crecimiento de las plantas o mezclado con otro tipo de efluente con alta carga de nitrógeno, fósforo y potasio.
- Existe un riesgo de contaminación de la cadena alimenticia en caso de una mala administración y falta de atención adecuada.
- Tareas de mantenimiento como la cosecha de la biomasa.
- Muchas especies de plantas acuáticas son sensibles a temperaturas bajas y por tanto es un proceso dependiente del clima y/o estación del año.

A pesar de las limitaciones enumeradas, esta tecnología presenta ventajas que la convierten en una alternativa viable ya que no deja de ser una tecnología amigable con el ambiente y preferible frente a otros bioagentes debido al bajo costo, la

abundancia frecuente en ecosistemas acuáticos y el fácil manejo (Rai, 2008, 2009). La rizosfera extensa de las plantas en los humedales proporciona una zona de cultivo enriquecida para los microbios implicados en la degradación (Rai, 2008). La zona sedimentaria del humedal proporciona una condición reductora conducente a la vía de eliminación del metal. Los humedales construidos resultaron eficaces en la reducción de la contaminación por metales pesados (Maine et al., 2016; Rai, 2008). Las propiedades físico-químicas de los humedales proporcionan muchos atributos positivos para remediar metales pesados y merecen ser tenidos en cuenta a la hora de evaluar el tratamiento adecuado de efluentes industriales.

A partir de la información generada en esta tesis, se plantea continuar los estudios dirigidos a poner a prueba esta tecnología en la aplicación de un caso real mejorando el diseño de la laguna y el modo en que se realizará la cosecha y el tratamiento de la misma.

Apéndice A

Tabla A.1: Peso seco inicial y final utilizados para el calculo de la TCR

Tratamiento	Especie	Peso seco inicial (g)	Peso seco final (g)
Control	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	1,3295
Control	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	1,2167
Control	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	1,2908
Control	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,7014
Control	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,6586
Control	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,5837
Control	<i>S. minima</i>	1,4672	1,6000
Control	<i>S. minima</i>	1,4672	1,9590
Control	<i>S. minima</i>	1,4672	1,8060
1 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	0,9199
1 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	1,0163
1 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	1,0462
1 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,6141
1 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,3796
1 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,5820
1 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,9913
1 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,7775
1 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,9274
5 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	1,2534
5 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	1,3046
5 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	0,9458
5 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,3770
5 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,5042
5 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,5133
5 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,5000
5 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,7691
5 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,5290
10 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	1,0185
10 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	1,1791
10 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	1,1920
10 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,4451
10 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,4998
10 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,2625
10 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,4513
10 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,4500
10 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,5834
20 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	0,7908
20 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	0,9383
20 mg/L	<i>A. filiculoides</i>	0,6795	0,9358
20 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,4652
20 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,4307
20 mg/L	<i>L. gibba</i>	0,5001	0,3295
20 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,4331
20 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,7761
20 mg/L	<i>S. minima</i>	1,4672	1,6821

Apéndice B

Tabla B.1: Concentración de CrD y CrP en el tratamiento con plantas y sin plantas.

Tratamiento	Tiempo (días)	Cr Disuelto (mg/L)	Cr Particulado (mg/L)
Sin plantas (A)	0	5,23	1,29
Sin plantas (A)	0	5,13	1,89
Sin plantas (A)	0	5,52	1,72
Sin plantas (A)	1	4,98	1,15
Sin plantas (A)	1	5,17	1,27
Sin plantas (A)	1	5,46	0,77
Sin plantas (A)	2	4,09	2,32
Sin plantas (A)	2	4,46	2,04
Sin plantas (A)	2	4,83	1,25
Sin plantas (A)	4	4,23	1,85
Sin plantas (A)	4	4,68	2,07
Sin plantas (A)	4	3,92	3,15
Sin plantas (A)	7	4,79	1,45
Sin plantas (A)	7	4,97	2,44
Sin plantas (A)	7	4,44	3,05
Sin plantas (A)	8	4,16	1,87
Sin plantas (A)	8	4,31	2,28
Sin plantas (A)	8	4,84	2,17
Con plantas (B)	0	5,03	1,19
Con plantas (B)	0	6,21	0,97
Con plantas (B)	0	4,87	1,51
Con plantas (B)	1	4,48	1,00
Con plantas (B)	1	4,65	1,76
Con plantas (B)	1	4,90	1,43
Con plantas (B)	2	3,95	1,39
Con plantas (B)	2	4,35	1,50
Con plantas (B)	2	3,95	2,20
Con plantas (B)	4	3,79	1,43
Con plantas (B)	4	3,63	1,95
Con plantas (B)	4	4,27	1,00
Con plantas (B)	7	4,70	0,27
Con plantas (B)	7	4,27	0,91
Con plantas (B)	7	3,98	0,86
Con plantas (B)	8	3,29	1,61
Con plantas (B)	8	4,05	1,22
Con plantas (B)	8	4,05	1,29

Apéndice C

Tabla C.1: Peso seco inicial y final del detrito

Extracción	Tiempo (días)	Peso Seco Detrito Inicial (g)	Peso Seco Detrito Final (g)
1	1	1,28	1,10
1	1	1,09	0,92
1	1	1,34	1,13
2	4	1,21	1,01
2	4	1,31	1,09
2	4	1,24	1,04
3	7	1,36	1,19
3	7	1,63	1,33
3	7	1,53	1,23
4	29	1,13	0,94
4	29	1,45	1,18
4	29	1,56	1,19
5	94	0,99	0,81
5	94	1,17	0,98
5	94	1,46	1,10
6	151	0,99	0,85
6	151	1,64	1,28
6	151	1,51	1,20
7	181	1,47	1,17
7	181	1,23	0,92
7	181	1,77	1,25

Bibliografía

- Adams, P. W. and Lamoureux, S. (2005). A literature review of the use of native northern plants for the re-vegetation of arctic mine tailings and mine waste. 17:2015.
- Agami, M. and Reddy, K. (1989). Inter-relationships between salvinia rotundifolia and spirodela polyrhiza at various interaction stages. *J Aquat Plant Manage*, 27:96–102.
- Ali, H., Khan, E., and Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals- Concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7):869–881.
- APHA (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association*, 20 ed.
- Arreghini, S. (2008). Bases para la clasificación , monitoreo y remediación de un río de llanura . Una aproximación a nivel de cuenca. *Tesis Doctoral*.
- ATDSR (2012). Toxicological Profile for Chromium. *U.S. Departament Of Health and Human Services*.
- Ater, M., Aït Ali, N., and Kasmi, H. (2006). Tolérance et accumulation du cuivre et du chrome chez deux espèces de lentilles d'eau : Lemna minor L. et Lemna gibba L. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 19(1):57–67.
- Autoridad de la Cuenca Matanza-Riachuelo (ACUMAR) (2012). Sistema de indicadores publicación anual.
- Bastviken, D., Olsson, M., and Tranvik, L. (2003). Simultaneous measurements of organic carbon mineralization and bacterial production in oxic and anoxic lake sediments. *Microbial Ecology*, 46(1):73–82.
- Bhalerao, S. A. and Sharma, A. S. (2015). Chromium: As an Environmental Pollutant. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 4(4):732–746.
- Bluskov, S., Arocena, J., Omotoso, O., and Young, J. (2005). Uptake, distribution, and speciation of chromium in brassica juncea. *International Journal of Phytoremediation*, 7(2):153–165.

- Boulton, A. and Boon, P. (1991). A review of methodology used to measure leaf litter decomposition in lotic environments: time to turn over an old leaf? *Marine and Freshwater Research*, 42(1981):1.
- Cañizares-Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA-MEXICO-*, 42(3):131–143.
- Carman, E. P., Crossman, T. L., and Gatliff, E. G. (1998). Phytoremediation of no. 2 fuel oil-contaminated soil. *Journal of Soil Contamination*, 7(4):455–466.
- Casares, M. V., de Cabo, L. I., Seoane, R. S., and de Iorio, A. F. (2014). Copper removal efficiency in a surface water and compartmentalization in the floating fern *Salvinia minima*.
- Chandra, P. and Kulshreshtha, K. (2004). Chromium Accumulation and Toxicity in Aquatic Vascular Plants. *The Botanical Review*, 70(October):313–327.
- Cunningham, S., Shann, J., Crowley, D. E., and Anderson, T. A. (1997). Phytoremediation of contaminated water and soil. ACS Publications.
- Cunningham, S. D., Berti, W. R., and Huang, J. W. (1995). Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in biotechnology*, 13(9):393–397.
- Delgado, M., Bigeriego, M., and Guardiola, E. (1993). Uptake of Zn, Cr and Cd by water hyacinths. *Water Research*, 27(2):269–272.
- Deng, H., Zhang, J., Chen, S., Yang, L., Wang, D., and Yu, S. (2016). Metal release/accumulation during the decomposition of *Potamogeton crispus* in a shallow macrophytic lake. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 42:71–78.
- Dhir, B., Sharmila, P., Pardha Saradhi, P., and Nasim, S. A. (2009). Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6):1790–1797.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M.G. and Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C. (2016). InfoStat versión 2016. *FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*.
- Diwan, H., Ahmad, A., and Iqbal, M. (2010). Uptake-related parameters as indices of phytoremediation potential.
- Du Laing, G., Ryckegem, G. V., Tack, F. M. G., and Verloo, M. G. (2006). Metal accumulation in intertidal litter through decomposing leaf blades, sheaths and stems of *Phragmites australis*. *Chemosphere*, 63(11):1815–1823.

- Eid, E. M., Shaltout, K. H., El-Sheikh, M. A., and Asaeda, T. (2012). Seasonal courses of nutrients and heavy metals in water, sediment and above- and below-ground *Typha domingensis* biomass in Lake Burullus (Egypt): Perspectives for phytoremediation. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 207(11):783–794.
- Espinoza-Quiñones, F. R., Da Silva, E. A., De Almeida Rizzutto, M., Palácio, S. M., Módenes, A. N., Szymanski, N., Martin, N., and Kroumov, A. D. (2008). Chromium ions phytoaccumulation by three floating aquatic macrophytes from a nutrient medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12):3063–3070.
- Ewel, J. J. (1976). Litter fall and leaf decomposition in a tropical forest succession in eastern Guatemala. *The Journal of Ecology*, pages 293–308.
- Feijoó, C. S. and Lombardo, R. J. (2007). Baseline water quality and macrophyte assemblages in Pampean streams: A regional approach. *Water Research*.
- Gardea-Torresdey, J., De la Rosa, G., Peralta-Videa, J., Montes, M., Cruz-Jimenez, G., and Cano-Aguilera, I. (2005). Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(2):225–232.
- Gaughhofer, J., Bianchi, V., and Chromium, E. M. (1991). Metals and their compounds in the environment. *Occurrence, Analysis, and Biological Relevance: Chromium*.
- Gordon, M., Choe, N., Duffy, J., Ekuan, G., Heilman, P., Muiznieks, I., Newman, L., Ruzsaj, M., Shurtleff, B. B., Strand, S., et al. (1997). Phytoremediation of trichloroethylene with hybrid poplars. ACS Publications.
- Hadad, H. R., Maine, M. A., and Bonetto, C. A. (2006). Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere*, 63(10):1744–1753.
- Harguinteguy, C. A., Cirelli, A. F., and Pignata, M. L. (2014). Heavy metal accumulation in leaves of aquatic plant *Stuckenia filiformis* and its relationship with sediment and water in the Suquia river (Argentina). *Microchemical Journal*, 114:111–118.
- Hillman, W. S. and Culley, D. D. (1978). The uses of duckweed: The rapid growth, nutritional value, and high biomass productivity of these floating plants suggest their use in water treatment, as feed crops, and in energy-efficient farming. *American Scientist*, 66(4):442–451.
- Hunt, R. (1990). *Basic Growth Analysis: Plant growth analysis for beginners*. Springer Netherlands, 1 edition.

- James, B. R. and Bartlett, R. J. (1983). Behavior of chromium in soils: Vii. adsorption and reduction of hexavalent forms. *Journal of Environmental Quality*, 12(2):177–181.
- Kingston, H. (1994). Epa method 3015 microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts. *Dusquesne University, Pittsburgh, PA*.
- Maine, M., Sune, N., Hadad, H., Sánchez, G., and Bonetto, C. (2007). Removal efficiency of a constructed wetland for wastewater treatment according to vegetation dominance. *Chemosphere*, 68(6):1105–1113.
- Maine, M., Sune, N., Hadad, H., Sánchez, G., and Bonetto, C. (2009). Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland. *Journal of Environmental Management*, 90(1):355–363.
- Maine, M. A., Duarte, M. V., and Suñé, N. L. (2001). Cadmium uptake by floating macrophytes. *Water research*, 35(11):2629–2634.
- Maine, M. A., Sánchez, G. C., Hadad, H. R., Ester, S., María, C., Alfonsina, G., Luca, D., De, M., and Mufarrege, M. (2016). Humedales construidos para tratamiento de efluentes de industrias metalúrgicas en Santa Fe , Argentina. VII:5–16.
- Maine, M. A., Suñé, N. L., and Lagger, S. C. (2004). Chromium bioaccumulation: Comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Research*, 38(6):1494–1501.
- Manahan, S. E. (2010). ENVIRONMENTAL CHEMISTRY NINTH EDITION.
- Melignani, E., de Cabo, L. I., and Faggi, A. M. (2015). Copper uptake by eichhornia crassipes exposed at high level concentrations. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11):8307–8315.
- Miretzky, P., Saralegui, A., and Cirelli, A. F. (2004). Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere*, 57(8):997–1005.
- Miretzky, P., Saralegui, A., and Cirelli, A. F. (2006). Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes. *Chemosphere*, 62(2):247–254.
- Mishra, K., Gupta, K., and Rai, U. N. (2009). Bioconcentration and phytotoxicity of chromium in Eichhornia crassipes. *Journal of Environmental Biology*, 30(4):521–526.
- Núñez, S. R., Negrete, J. M., Rios, J. A., Hadad, H. R., and Maine, M. (2011). Hg, cu, pb, cd, and zn accumulation in macrophytes growing in tropical wetlands. *Water, Air, & Soil Pollution*, 216(1-4):361–373.

- Olguín, E. J., Hernández, E., and Ramos, I. (2002). The Effect of Both Different Light Conditions and the pH Value on the Capacity of *Salvinia minima* Baker for Removing Cadmium, Lead and Chromium. *Acta Biotechnologica*, 22(1-2):121–131.
- Palmer, C. D. and Puis, R. W. (1994). Palmer and Puis Natural Attenuation of Hexavalent Chromium in Ground Water and Soils. Environmental Protection Agency.
- Pandey, N. and Sharma, C. P. (2003). Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environmental and Experimental Botany*, 49(3):195–200.
- Peterson, H. and Moody, M. (1997). *Modified APHA Medium for Testing Lemna sp. minor*. Saskatchewan Research Council, Water Quality Section Laboratory.
- Prado, C., Rodríguez-Montelongo, L., González, J. A., Pagano, E. A., Hilal, M., and Prado, F. E. (2010). Uptake of chromium by *Salvinia minima*: Effect on plant growth, leaf respiration and carbohydrate metabolism. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3):546–553.
- Rai, P. K. (2008). Heavy metal pollution in aquatic ecosystems and its phytoremediation using wetland plants: an ecosustainable approach. *International journal of phytoremediation*, 10(2):133–160.
- Rai, P. K. (2009). Heavy metal phytoremediation from aquatic ecosystems with special reference to macrophytes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39(9):697–753.
- Rakhshae, R., Khosravi, M., and Ganji, M. T. (2006). Kinetic modeling and thermodynamic study to remove Pb(II), Cd(II), Ni(II) and Zn(II) from aqueous solution using dead and living *Azolla filiculoides*. *Journal of Hazardous Materials*, 134(1-3):120–129.
- Raskin, I., Ensley, B. D., et al. (2000). *Phytoremediation of toxic metals*. John Wiley and Sons.
- Riedel, G. F. (1988). Interspecific and geographical variation of the chromium sensitivity of algae.
- Robinson, B. (1999). Soil Amendments Affecting Nickel and Cobalt Uptake by *Berkheya coddii*: Potential Use for Phytomining and Phytoremediation. *Annals of Botany*, 84(6):689–694.
- Romero, L. M., Smith, T. J., and Fourqurean, J. W. (2005). Changes in mass and nutrient content of wood during decomposition in a south Florida mangrove forest. *Journal of Ecology*, 93(3):618–631.

- Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., and Raskin, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nature biotechnology*, 13(5):468–474.
- Schaller, J., Brackhage, C., Mkandawire, M., and Dudel, E. G. (2011). Metal/metalloid accumulation/remobilization during aquatic litter decomposition in freshwater: a review. *Science of the Total Environment*, 409(23):4891–4898.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., and Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment international*, 31(5):739–753.
- Sobrero, M., Beltrano, J., and Ronco, A. (2004). Comparative response of lemnaeae clones to copper (ii), chromium (vi), and cadmium (ii) toxicity. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 73(2):416–423.
- St. John, T. (1980). Influence of litterbags on growth of fungal vegetative structures. *Oecologia*, 46(1):130–132.
- Staves, R. P. (1980). *Chromium uptake and its effects on the growth of duckweeds*.
- Staves, R. P. and Knaus, R. M. (1985). Chromium removal from water by three species of dyckweeds. *Aquatic Botany*, 23.
- Stumm, W. and Morgan, J. J. (1996). Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters. *Aquatic chemistry*, page 1022.
- Suñe, N., Sánchez, G., Caffaratti, S., and Maine, M. A. (2007). Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environmental Pollution*, 145(2):467–473.
- Tiwari, K. K., Singh, N. K., and Rai, U. N. (2013). Chromium phytotoxicity in Radish (*Raphanus sativus*): Effects on metabolism and nutrient uptake. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91(3):339–344.
- USEPA, E. (1995). Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. *Test Methods for Evaluating Solid Waste*,.
- Valiela, I. (1984). Importance of chemical composition of salt marsh litter on decay rates and feeding by detritivores. *Bulletin of Marine Science*, 35(3):261–269.
- Wieder, R. K. and Lang, G. E. (1982). A critique of the analytical methods used in examining decomposition data obtained from litter bags. *Ecology*, 63(6):1636–1642.
- Wiegert, R. G. and Evans, F. C. (1964). Primary production and the disappearance of dead vegetation on an old field in southeastern michigan. *Ecology*, 45(1):49–63.

- Windham, L., Weis, J. S., and Weis, P. (2004). Metal dynamics of plant litter of *spartina alterniflora* and *phragmites australis* in metal-contaminated salt marshes. part 1: Patterns of decomposition and metal uptake. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(6):1520–1528.
- Witkamp, M. and Crossley Jr, D. (1966). Role of arthropods and microflora in breakdown of white oak litter. Technical report, Oak Ridge National Lab., Tenn.
- Zayed, A. ., Gowthaman, S., and Norman, T. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*, Jun, 27(3).
- Zayed, A. M. and Terry, N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and soil*, 249(1):139–156.
- Zhang, W., Cai, Y., Tu, C., and Ma, L. Q. (2002). Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *Science of the Total Environment*, 300(1):167–177.
- Zhao, M. and Duncan, J. R. (1997). Batch removal of hexivalent chromium by *azolla filiculoides*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 26(3):179–182.
- Zurayk, R., Sukkariyah, B., Baalbaki, R., and Ghanem, D. A. (2001). Chromium Phytoaccumulation from Solution by Selected Hydrophytes. *International Journal of Phytoremediation*, 3(3):335–350.