

Fitoextracción de Pb, Cr, Ni, y Zn por la planta acuática *Limnobium laevigatum* y su potencial uso en el tratamiento de aguas residuales

Daniela S. Arán¹, C.A. Harguinteguy¹, A. Fernández Cirelli², M.L. Pignata¹

¹ Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), CONICET y Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC, Cba, Argentina. ² Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA) UBA-CONICET, Centro de Estudios Transdisciplinarios del Agua (CETA) y Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Bs As, Argentina.

E-mail: daniaran91@gmail.com

RESUMEN: La contaminación de ambientes acuáticos representa un problema a escala mundial, dado que los metales pesados están ampliamente distribuidos. Para la remediación de estos ambientes, una de las técnicas promisorias es la fitorremediación a través del uso de macrófitas acuáticas. Se propuso analizar la acumulación de plomo, cromo, níquel y zinc y las respuestas al estrés de la macrófita flotante de vida libre *Limnobium laevigatum*.

L. laevigatum fue expuesta a una mezcla de concentraciones crecientes de Cr, Ni, Pb y Zn, donde las concentraciones más bajas se correspondieron con los valores establecidos en la Ley Nacional de Residuos Peligrosos 24051/91 y la más alta con los valores máximos de descarga permitidos en la Provincia de Córdoba [ex DiPAS, Decreto 415/99]. La cosecha de las plantas se realizó cada semana durante 28 días. Se analizó la acumulación de metales y parámetros fisiológicos. La comparación entre los tratamientos y los tiempos de exposición se realizó mediante ANOVA a dos factores.

La bioacumulación de los metales fue mayor en las raíces que en las hojas y mostró una estrecha relación con el tiempo y la concentración. Por sus altos niveles de acumulación, la planta acuática estudiada puede ser considerada como una especie hiperacumuladora de Zn y Ni. *L. laevigatum* mostró ser tolerante a los metales a medianas concentraciones, mostrando síntomas de toxicidad a altas concentraciones más de 21 días de exposición. Los efectos tóxicos se vieron reflejados en la disminución de los pigmentos fotosintéticos y el aumento de la oxidación de clorofila a.

Teniendo en cuenta la capacidad de acumulación y su nivel de tolerancia, *L. laevigatum* es una especie de interés para su uso en fitorremediación de aguas contaminadas con niveles moderados de metales y en las primeras semanas de exposición.

INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua es de suma importancia para la vida y el desenvolvimiento económico de cualquier región del mundo. Es por esta razón que la contaminación de los ambientes acuáticos es uno de los grandes problemas a nivel mundial, en especial para los países periféricos y con economías emergentes, con

riesgos tanto para la salud humana a través del consumo de agua o el contacto con los contaminantes, como para los ecosistemas acuáticos (Fernández-Cirelli y du Mortier, 2005).

El aumento progresivo de actividades humanas, así como las derivadas de la explotación de recursos naturales, ha contribuido en forma sistemática a emisiones crecientes de metales pesados, con el consecuente deterioro de la calidad ambiental. Los metales pesados, por su carácter persistente y no degradable, una vez incorporados al ambiente son de difícil eliminación. Desde el punto de vista químico los metales pesados son elementos que tienen elevadas masas atómicas, un peso específico mayor o igual a 5 g cm^{-3} (Passow et al., 1961), y han sido asociados con su potencial toxicidad o eco-toxicidad. A muchos de ellos se los considera elementos traza ya que se encuentran en baja concentración (inferior a 0,1 %) en algunos compartimentos, como suelos, plantas, sedimentos y aguas (Förstner y Wittmann, 1983).

Si bien el aporte de metales pesados a los ecosistemas acuáticos procede de fuentes naturales, actualmente el mayor aporte de éstos es de origen antrópico y está dado por los desagües pluviales, las descargas de efluentes industriales, escorrentías en suelos agrícolas y urbanos y actividades mineras, entre otras. Sin embargo, en estas actividades el aporte de metales frecuentemente está asociado a una inadecuada gestión de las descargas de aguas residuales en cuerpos de aguas superficiales, llegando a ríos, arroyos y lagos como material disuelto o suspendido (Fu et al., 2013; Shinn et al., 2009).

En relación a sus efectos sobre los seres vivos, a pesar de que algunos metales pesados son esenciales para la vida (como cofactores de metaloproteínas y enzimas), también representan un riesgo para la salud humana y del ambiente debido a su gran persistencia, elevada toxicidad, al hecho de que no pueden ser degradados biológicamente y a la facilidad con que son incorporados en las cadenas tróficas (Duman et al., 2009). Muchos metales afectan directamente procesos biológicos causando reducción en el crecimiento, inhibición de la fotosíntesis y respiración, y modificación funcional de organelas celulares (Vangronsveld y Clijsters, 1994). Además, la exposición de plantas a metales pesados puede derivar en un aumento de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO), causando estrés oxidativo (Apel y Hirt, 2004). Dado que las moléculas lipídicas y los lípidos insaturados son sensibles a la oxidación por ERO, la peroxidación lipídica inducida por metales pesados es un indicador de estrés oxidativo (Metwally et al., 2005). El malonaldehído (Nichols et al., 2000) es resultado de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, componentes estructurales de las membranas celulares (Cañas et al., 1997), es decir, es un indicador de la producción de radicales libres y su consecuente daño tisular (Ozturk et al., 2010).

Debido a la toxicidad de los metales pesados, en los últimos años se ha prestado atención a los métodos para la remoción de éstos en efluentes que van a ser descargados en aguas superficiales. La fitorremediación es un método no convencional para el tratamiento de aguas residuales, que está ganando interés por sus múltiples ventajas dentro de las que se destacan su bajo costo y el ser una metodología amigable para el ambiente (Olguín y Sánchez-Galván, 2012). Existen muchos estudios que han demostrado que la construcción de humedales artificiales es un método efectivo para la remoción de metales pesados de aguas contaminadas (Kara, 2005). Esta técnica involucra la utilización de macrófitas acuáticas, que están representadas por

plantas genuinamente acuáticas (hidrófitas) y anfibias (anfifitas) (Wetzel, 2001). Para que una planta (especie) sea empleada en fitorremediación de aguas contaminadas con metales debe cumplir ciertos requisitos: ser tolerante a altos niveles del metal que se desea extraer; acumular elevados niveles de él en partes cosechables; tener un rápido crecimiento; producir gran biomasa y poseer un abundante sistema radical (Garbisu y Alkorta, 2001).

Los metales pesados, al no ser degradados persisten durante largos períodos de tiempo en el ambiente (Monferrán et al., 2012) y pueden utilizar las mismas vías que los nutrientes para ser absorbidos y acumulados por las plantas (Choi et al., 2006). Por su parte, las macrófitas acumulan metales en sus hojas (Greger et al., 1995) incorporándolos desde el agua o por translocación desde la raíz hacia las partes superiores de la planta (Harguinteguy et al., 2012). La acumulación de metales en macrófitas es el resultado, por un lado, de la concentración de éstos en el agua y, por otro, del tiempo en que los organismos están expuestos a ellos. Diversos autores señalan que distintas especies de plantas acuáticas difieren ampliamente en su capacidad para acumular metales (Monferrán et al., 2012). Según Samecka-Cymerman y Kempers, (2004), la contaminación de aguas superficiales puede ser demostrada por el aumento de las concentraciones de metales pesados en las plantas acuáticas, lo que evidencia el potencial de éstas en estudios de biomonitoreo y fitorremediación. Zayed et al., (1998), propusieron dos criterios para definir a las plantas acuáticas como hiperacumuladoras de metales: una concentración del metal en el tejido mayor que 0,5 % del peso seco de la planta y un factor de bioconcentración (FBC) mayor a 1000. El FBC es el índice mayormente utilizado para describir la capacidad de las plantas para concentrar los metales desde una fase líquida. Por otro lado, el factor de translocación (FT) (Giere et al., 1988) es un indicador de la movilidad de los metales en la planta, y describe la translocación de los metales desde la raíz hacia los órganos aéreos. Valores elevados de FT (>1) implican una alta capacidad de translocación (Soda et al., 2012).

Una especie acuática de interés que cuenta con pocos estudios es *Limnobium laevigatum* (Humb. & Bonpl. ex Willd Heine). Esta macrófita acuática perenne, de la familia Hydrocharitaceae, se encuentra distribuida en los países del Neotrópico (Cook y Urmi-König, 1983). Es una especie flotante pero también puede encontrarse enraizada en zonas de suelo muy húmedo. Las raíces principales, con largos pelos radiculares, poseen un rápido crecimiento geotrópico, mientras que las raíces secundarias son finas con un menor crecimiento. Los tallos son cortos y de éstos nacen hojas pecioladas ubicadas en forma de roseta, típicamente poseen una almohadilla en la superficie abaxial de la hoja formada por un tejido parenquimatoso, que puede alcanzar 1 cm de espesor (Hernandez y Rincon, 2014). Esta planta presenta dos tipos de reproducción: sexual, por medio de la producción de flores y semillas, y clonal, por la producción de nuevos clones (rametos) que forman parte de una misma planta madre hasta la separación (Aponte y Pacherras, 2013). Dentro de las especies acuáticas, *Limnobium laevigatum* es promisoría para ser empleada en fitorremediación de aguas residuales, ya que presenta una alta tasa de crecimiento poblacional y una elevada eficacia en la disminución de la demanda química de oxígeno (DQO), cercana al 80 % (Castillo et al., 2012). Por otra parte, estudios realizados en Colombia mostraron que esta especie muestra una acumulación elevada de Cr (Hernandez y Rincon, 2014).

HIPÓTESIS

Elevadas concentraciones de metales pesados en el medio de cultivo a distintos tiempos de exposición se relacionan con la acumulación de éstos en los tejidos de *L. laevigatum* y alteran sus respuestas fisiológicas.

OBJETIVOS

Objetivo General: Caracterizar la bioacumulación de Pb, Cr, Ni, y Zn y evaluar el grado de tolerancia a estos metales en la macrófita flotante, *Limnobium laevigatum*, para su potencial empleo en el tratamiento de aguas residuales de origen industrial.

Objetivos Específicos:

- Estudiar experimentalmente la capacidad de acumulación de metales (cromo, níquel, plomo y zinc) en la especie de planta acuática *Limnobium laevigatum*, cuando es expuesta a medios de cultivo con mezclas de éstos en concentraciones crecientes.
- Analizar la acumulación de Pb, Cr, Ni, y Zn en *L. laevigatum* cuando se la cosecha luego de 7, 14, 21 y 28 días de exposición a mezclas de estos metales.
- Identificar el tejido donde tiene lugar la mayor acumulación de estos metales en *L. laevigatum*.
- Analizar la tolerancia de la especie frente a la acumulación de Pb, Cr, Ni, y Zn mediante la evaluación de parámetros indicadores de daño fisiológico.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. Obtención y acondicionamiento del material vegetal. Descripción del ensayo de acumulación.

Se colectaron individuos de similar tamaño de la especie *L. laevigatum* en el lago San Roque, próximos a la desembocadura del arroyo Las Mojaras. El sitio fue seleccionado considerando las características pseudoprístinas del lugar (Harguinteguy et al., 2014) y la abundancia de esta especie, por lo que la recolección de las muestras tuvo un bajo impacto sobre la densidad poblacional.

Las plantas colectadas fueron enjuagadas “in situ” y se trasladaron a un invernadero (IMBIV) donde fueron lavadas minuciosamente con agua corriente para eliminar cualquier resto de material adherido a su superficie. Luego se colocaron 400 gramos (peso fresco) de individuos de similar tamaño en peceras de 100 L de capacidad y se mantuvieron en cultivo hidropónico, en un medio preparado con agua corriente más una solución nutritiva al 0,10 % V/V (Aponte y Pacherras, 2013) [solución nutritiva: 5,8 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 8,5 g L⁻¹ de KNO₃ y 5,3 g L⁻¹ NH₄NO₃ según (Franzaring et al., 2007)]. La temperatura se mantuvo entre 18-22 °C, el pH entre 7-8, la fuente de luz estuvo conformada por lámparas de bajo consumo de 85 W con una irradiación superior a 100 µE m² s⁻¹ y ciclos de luz-oscuridad de 14:10 h, respectivamente. Además se colocaron bombas sumergibles (marca Baojie, modelo BL-200) para la recirculación de agua con el objetivo generar una corriente de agua que evite el precipitado de partículas en el fondo y/o la deposición de éstas

sobre la superficie de las raíces y hojas. Las plantas se mantuvieron bajo estas condiciones por cuatro semanas para su aclimatación y durante el tiempo de exposición a los tratamientos con metales.

Para evaluar la capacidad de acumulación de *L. laevigatum*, se la expuso a tres tratamientos con concentraciones crecientes de soluciones mezcla de níquel (Ni), zinc (Zn), plomo (Pb) y cromo (Cr), y se contó con un grupo control (sin la adición de metales). Para determinar las concentraciones se realizaron ensayos preliminares tomando como referencia para las concentraciones más bajas los niveles guía de calidad de agua dulce superficial para protección de vida acuática, establecidos por la Ley Nacional de Residuos Peligrosos 24.051 (Argentina, 1991) y para las más altas los límites máximos permitidos para efluentes aptos para su descarga en aguas superficiales en la Provincia de Córdoba (Dirección Provincial de Agua y Saneamiento – provincia de Córdoba) (Resolución 415/99)). Las concentraciones utilizadas entonces para el Control, el Tratamiento 1, el Tratamiento 2 y el Tratamiento 3 fueron las siguientes respectivamente: Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$): 0, 1, 70, 1000; Cr ($\mu\text{g L}^{-1}$) 0, 4, 70, 1000; Ni ($\mu\text{g L}^{-1}$) 0, 25, 70, 500; Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$) 0, 30, 70, 100.

Cada tratamiento fue llevado a cabo por triplicado, es decir que se dispusieron doce peceras a las cuales se les asignaron los tratamientos de forma aleatoria. Al momento inicial, y a los 7, 14, 21 y 28 días de haber comenzado los tratamientos se cosecharon aproximadamente 100 g de plantas de cada uno de las peceras.

Análisis de metales pesados

Cuantificación de metales pesados

Material vegetal liofilizado (1 g de peso seco de hojas-tallos y 0,6 g de peso seco de raíz) se llevó a cenizas en un horno a 450 °C durante 4 h. Luego las cenizas fueron digeridas con HNO₃ concentrado (Nekrasova et al., 2011) y el residuo sólido fue separado por filtración utilizando un filtro de papel de 2,5 μm (Scheicher & Schüll, Blauband 5893, N°: 300210) y la solución resultante se diluyó en agua ultra pura hasta un volumen final de 10 mL. Finalmente, el contenido de Pb, Cr, Ni, y Zn fue analizado mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS). Las muestras control se analizaron de la misma manera. Los resultados se expresaron en mg kg^{-1} de peso seco. El control de calidad se realizó con material certificado (\pm la incertidumbre para el valor certificado, con un 95% de confianza) hojas de tabaco Oriental (ICHTJ-CTA-OTL-1), empleando el mismo protocolo con el fin de verificar el método analítico.

Factor de Bioconcentración (FBC)

Se calculó el factor de bioconcentración (FBC) como la concentración proporcional de metal en la planta (mg kg^{-1} peso seco) con respecto a la concentración (mg L^{-1}) del metal en el medio de cultivo (Olguín y

Sánchez-Galván, 2012):
$$\text{FBC} = \frac{\text{Concentración del metal en la planta}}{\text{Concentración inicial del metal en la solución}} \quad (1)$$

Factor de traslocación (FT)

El factor de translocación fue calculado dividiendo la concentración del metal acumulado en el tejido aéreo de la planta (mg kg^{-1} peso seco) por la concentración del metal acumulado en las raíces (mg kg^{-1} peso seco)

(Soda et al., 2012):
$$\text{FT} = \frac{\text{Concentración del metal en las hojas y tallos}}{\text{Concentración del metal en la raíz}} \quad (2)$$

*Determinación de parámetros fisiológicos en *Limnobium laevigatum**

Cuantificación de carotenoides, clorofilas y feofitinas

Se pesaron 20 mg de material vegetal y se agregaron 10 mL de etanol al 96 % V/V a temperatura ambiente. Luego se homogeneizó la muestra a 1000 rpm durante un minuto, se filtró con papel de filtro < 10 µm y en la solución se midió la absorbancia de clorofila a (649 nm) y carotenoides (470 nm). Posteriormente se agregó 1 mL de HCl 0,06 M a 5 mL del extracto de clorofilas a fin de lograr la formación de feofitinas. Luego de 10 minutos se midió la densidad óptica (DO) a 654 y 666 nm. Las mediciones se realizaron con espectrofotómetro UV-Visible (Beckman DU 7000, USA). Sobre la base de peso seco se calcularon las concentraciones (en mg g⁻¹ P.S.) de los pigmentos de acuerdo con Wintermans y De Mots (1965).

4.3.2. Cuantificación de malondialdehído (MDA)

Se midió la concentración de MDA (Nichols et al., 2000) mediante un método colorimétrico propuesto por Heath y Packer, (1968). Se homogeneizaron, a 1000 rpm en 2,5 mL de agua destilada, 50 mg de tallos-hojas y por otro lado 70 mg de raíces de *L. laevigatum*. Luego a cada tejido se le agregó un volumen igual de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) al 0,5 % P/V en solución de TCA (ácido tricloroacético) al 20 % P/V. Las muestras se incubaron a 95 °C durante 30 minutos y se detuvo la reacción con un baño de hielo. Se filtró con papel de filtro < 10 µm, y se leyó la DO a 532 nm, restando la absorción no específica a 600 nm (Stewart y Bewley, 1980) con un espectrofotómetro UV-Visible (Beckman DU 7000, USA). El contenido de MDA se calculó a partir del coeficiente de extinción molar $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron en µmol g⁻¹ P.S.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados fue realizado utilizando el software InfoStat. La comparación entre los tratamientos y los tiempos de cosecha se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) a dos factores para determinar si existen diferencias significativas entre ellos con un nivel de significancia de $p < 0,01$ y el test a posteriori de DGC ($p < 0,05$). Los supuestos del análisis de la varianza (distribución normal, independencia, homogeneidad de varianza) fueron previamente verificados analíticamente y gráficamente para cada una de las variables medidas. Para cada tratamiento, las determinaciones químicas se realizaron por triplicado, utilizándose en los análisis estadísticos el valor promedio de las mismas.

RESULTADOS

*Análisis de metales pesados en *Limnobium laevigatum**

Acumulación de Plomo

La acumulación de Pb en hojas y raíces de la planta acuática, *L. laevigatum*, mostró un incremento significativo con el aumento en la concentración de este metal en los diferentes tratamientos (Figura 1). En todos estos, la acumulación de Pb fue, como mínimo, tres veces mayor en la raíz que en la hoja. Por otro

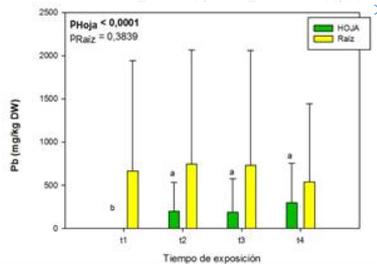
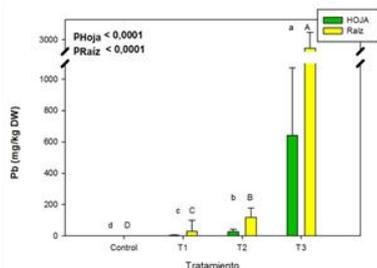


Figura 1 (izq).- Acumulación de Pb en *L. laevigatum* a distintas concentraciones del metal. **Figura 2 (der).** - Acumulación de Pb en *L. laevigatum* a lo largo del tiempo de exposición. Diferencias significativas entre los tratamientos se señalizan con distintas letras minúsculas para la hoja y mayúsculas para la raíz.

lado, también se observó un aumento significativo en la acumulación de Pb en las hojas a lo largo del tiempo de exposición, no así en la raíz donde no hubo diferencias (Figura 2).

5.1.2. Acumulación de Cromo

La acumulación de Cr en hojas y raíces de la planta acuática, *L. laevigatum*, mostró un incremento significativo con el aumento en la concentración del metal en los diferentes tratamientos (Figura 3). En general, la acumulación en la raíz fue tres veces mayor a lo acumulado en hojas. A lo largo del tiempo de exposición (Figura 4), también se observó un incremento significativo en la acumulación de Cr en hoja y raíz, siendo en todos los casos más de tres veces mayor la concentración de Cr en las raíces.

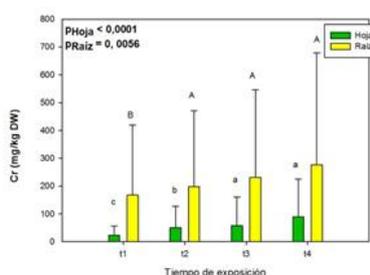
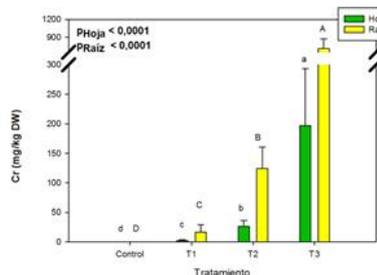


Figura 3 (izq).- Acumulación de Cr en *L. laevigatum* a distintas concentraciones del metal. **Figura 4 (der).** - Acumulación de Cr en *L. laevigatum* a lo largo del tiempo de exposición. Diferencias significativas entre los tratamientos se señalizan con distintas letras minúsculas para la hoja y mayúsculas para la raíz.

5.1.3. Acumulación de Níquel

La acumulación de Ni en hojas y raíces de la planta acuática, *L. laevigatum*, mostró un incremento significativo con el aumento en la concentración de este metal en los diferentes tratamientos (Figura 5). En todos estos, la acumulación de Ni fue mayor en la raíz que en la hoja, observándose una situación similar a lo largo del tiempo de exposición (Figura 6), donde hubo un incremento en la concentración de Ni en estos tejidos hasta el día 21 de exposición.

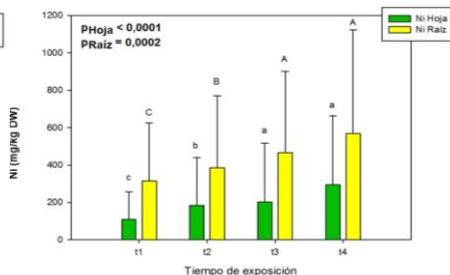
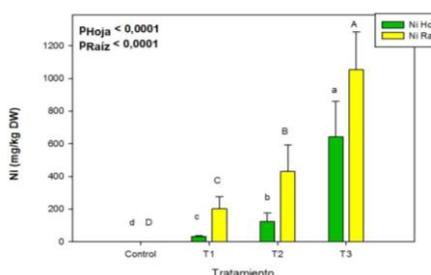


Figura 5 (izq).- Acumulación de Ni en *L. laevigatum* a distintas concentraciones del metal. **Figura 6 (der).** - Acumulación de Ni en *L. laevigatum* a lo largo del tiempo de exposición. Diferencias significativas entre los tratamientos se señalizan con distintas letras minúsculas para la hoja y mayúsculas para la raíz.

5.1.4. Acumulación de Zinc

La acumulación de Zn en hoja de la planta acuática, *L. laevigatum*, mostró un incremento significativo con el aumento en la concentración de metales en los diferentes tratamientos (Figura 7). Sin embargo, en la raíz la acumulación de Zn aumentó con las concentraciones crecientes del metal pero decayó en el tratamiento 3 (Figura 7). La acumulación de Zn a lo largo del tiempo de exposición sólo mostró diferencias significativas en las raíces de la macrófita flotante siendo mayor a los 28 días (Figura 8).

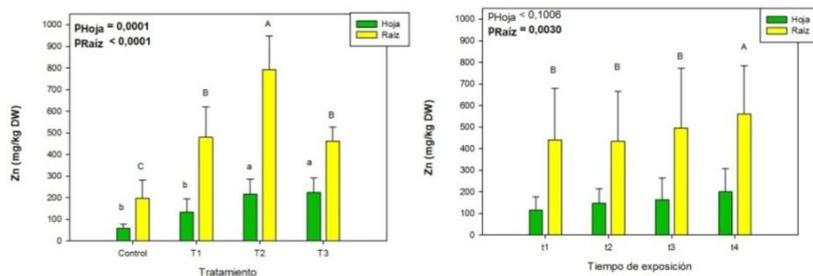


Figura 7 (izq).- Acumulación de Ni en *L. laevigatum* a distintas concentraciones del metal. **Figura.8 (der)** - Acumulación de Ni en *L. laevigatum* a lo largo del tiempo de exposición. Diferencias significativas entre los tratamientos se señalizan con distintas letras minúsculas para la hoja y mayúsculas para la raíz.

Factor de Bioconcentración (FBC) y Factor de Traslocación (FT)

En la Figura 9 se muestra el factor de bioconcentración (FBC) en hojas y raíces y el factor de translocación (Giere et al., 1998). Dichos factores se evaluaron en el tratamiento número 2 debido a que en éste se utilizaron iguales concentraciones para todos los metales. El análisis se hizo a partir de los 14 días de exposición con la finalidad de poner énfasis en las diferencias entre los metales y reducir la variación debida al tiempo (Figuras 2, 4, 6 y 8).

El FBC mostró que la concentración de todos los metales estudiados en raíz y los de Ni y Zn en hojas superaron en más de mil veces las concentraciones en el medio de cultivo. Además, tanto en hoja como en raíz, los mayores valores del FBC se observan en Ni y Zn, y en todos los casos, las plantas bioconcentraron más en raíces que en hojas.

El factor de translocación (Giere et al., 1998) mostró valores inferiores a uno para todos los metales estudiados (Figura 9), no obstante, la translocación de raíz a hojas de Pb fue significativamente mayor a la de Cr, Ni y Zn, con un valor del FT de 0,42.

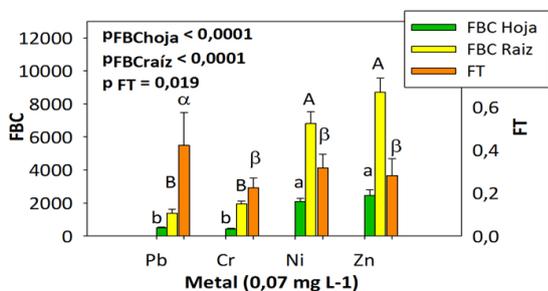


Figura 9. Factor de bioconcentración (FBC) en hoja y raíz y factor de traslocación (Giere et al., 1998) de *L. laevigatum* calculados para el tratamiento 2 (0,07 mg L⁻¹) a partir de los 14 días de exposición (tiempo 2). Diferencias significativas entre el FBC de cada uno de los metales se señalizan con distintas letras minúsculas para la hoja y mayúsculas para la raíz. Diferencias significativas para el FT se señalan con diferentes letras del alfabeto griego.

Efectos de la mezcla de los metales Cromo, Plomo, Níquel y Zinc sobre parámetros fisiológicos en Limnobia laevigatum

La concentración de pigmentos fotosintéticos reveló una disminución cercana al 20 % del contenido de clorofila a, feofitina a y carotenoides en hojas y tallos luego de 21 días de exposición (tiempo 3) y cercana al 30 % en el tratamiento de mayor concentración (tratamiento 3) (Figuras 10 y 11). La degradación de clorofilas a feofitinas mostró un aumento significativo en el tratamiento de mayor concentración de metales (tratamiento 3) y también luego de 21 días de exposición (tiempo 3) (Figuras 12 y 13).

Se observó un aumento significativo de los niveles de malondialdehído (Nichols et al., 2000) en raíz en los tratamientos 1 y 2 (Figura 14), así como un incremento significativo en etapas tempranas de exposición (tiempo 2), previo a los 28 días de exposición (tiempo 4) (Figura 15). No se encontraron diferencias en la concentración de productos de peroxidación de lípidos de membrana (MDA) en las hojas.

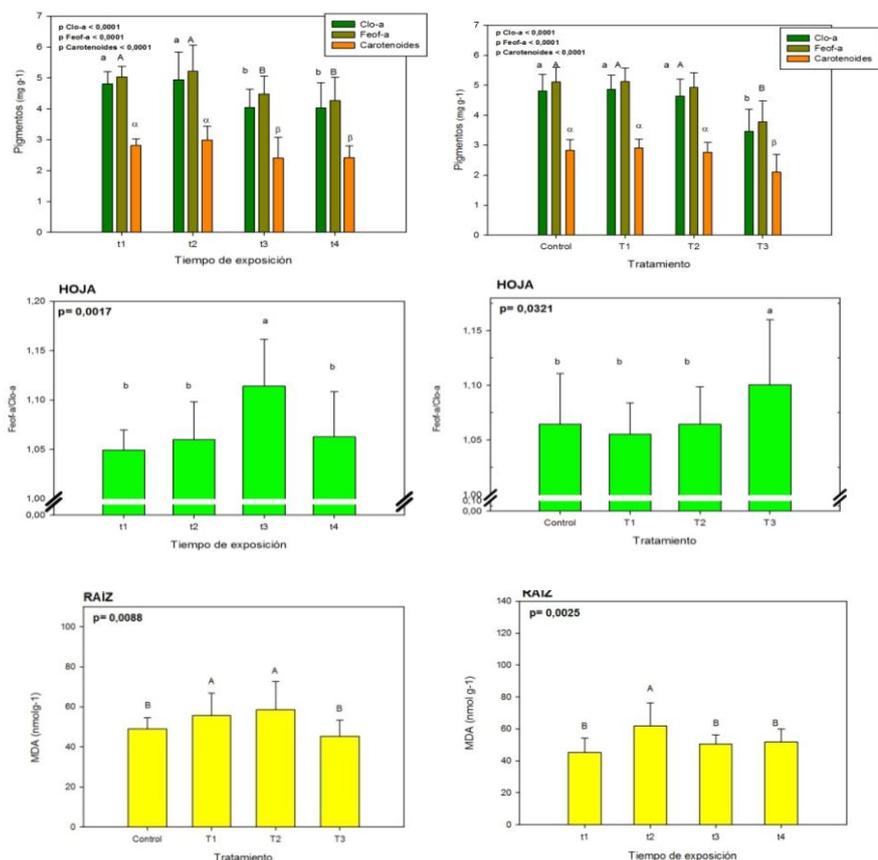


Figura 10 (arriba izq); 11 (arriba der.); 12 (abajo izq); 13 (abajo der.).

Concentración de pigmentos fotosintéticos en *L. laevigatum* a diferentes tiempos de exposición. Los valores son presentados como la concentración media ± DE (n=12). El análisis ANOVA fue realizado para determinar diferencias significativas en los pigmentos entre tiempos de exposición. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05) según el teste DCG (Fig 10 y 11). Letras minúsculas para la Clo-a, mayúsculas para la Feof-a y griegas para los carotenoides).

Figura 14 (izq) y 15 (der). Niveles de productos de peroxidación de lípidos de membranas (MDA) en raíz de *L. laevigatum*. Los valores son presentados como la concentración media ± DE (n=12). El análisis ANOVA fue realizado para determinar diferencias significativas entre tratamientos y tiempos de exposición. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05) según el teste DCG.

DISCUSIÓN

Acumulación de metales pesados, FBC y FT

La acumulación de los metales en la macrófita *L. laevigatum* fue dependiente de la concentración del metal, coincidiendo con lo citado por otros autores para numerosas especies de plantas acuáticas de vida libre y hojas flotantes (Vesely et al., 2011; Hadad et al., 2011; Mishra y Tripathi, 2008).

La acumulación de Pb y Cr en *L. laevigatum* fue mayor que la observada en *S. auriculata*, *S. minima* y *A. filiculoides* (Vesely et al., 2011) y en *E. crassipes* y *S. polyrrhiza* (Mishra y Tripathi, 2008) respectivamente. Además, la acumulación de Cr y Pb fue mayor en la raíz que en las hojas, como se cita para *Vallisneria spiralis* que acumuló 290 mg kg⁻¹ de Pb en raíz y 124 mg kg⁻¹ en hojas (Gupta y Chandra, 1994), y en *Salvinia herzogii* y *P. stratiote* que acumularon ocho veces más Cr en raíces que en hojas (Maine et al., 2004). En el presente estudio se encontró que la acumulación de Ni fue mayor en las raíces que en las hojas lo que puede deberse a que este elemento es tomado rápidamente por el sistema radical (Ali et al., 2008) y por su rol como micronutriente (Assunção et al., 2003). Duman et al., (2009) citan que la acumulación de Ni en raíces y hojas de berro expuesto a 1 mg L⁻¹ durante una semana no llegaron a diferenciarse del control, mientras que hojas de *Elodea canadensis* al ser expuesta a 0,5 mg L⁻¹ acumularon 700 mg kg⁻¹ (Maleva et al., 2009). *L. laevigatum* en el presente estudio mostró una acumulación en raíces de 800 mg kg⁻¹ en la primera semana de exposición. Para Zn, *L. laevigatum* acumuló concentraciones mayores a las observadas en *Pistia stratiotes* y *Spirodela polyrrhiza* a una concentración de 1 mg L⁻¹ Zn en el medio de cultivo (Mishra y Tripathi, 2008) y similares a las citadas para *Ceratophyllum demersum* luego de ser expuesta a 3 mg L⁻¹ Zn

durante 15 días (Umebese y Motajo, 2008). La máxima acumulación de Zn en la raíz fue en el tratamiento 2. Posiblemente la menor acumulación en este órgano para el tratamiento 3, de mayor concentración, se deba a la competencia en la absorción de los metales, habiéndose demostrado que la presencia de altas concentraciones de Pb impiden la entrada de cationes Zn en el sistema radicular (García Vargas et al., 2007).

Con respecto al tiempo de exposición, en hojas de *L. laevigatum* se acumularon cantidades muy bajas de Pb y Cr en la primera etapa de exposición, pero aumentaron significativamente en etapas tardías; mientras que en raíz, la máxima acumulación se observó en la primera etapa de exposición. Una situación similar fue observada por Maine et al. (2004) para Cr en raíces de *S. herzogii* y *P. stratiote*, donde la captación de Cr fue un proceso rápido que ocurrió durante las primeras 24 horas, y luego aumentó pero en menor medida a lo largo de los 31 días. Probablemente lo observado para Cr y Pb, como así también para Ni y Zn, en raíces de *L. laevigatum* esté relacionado con una disminución de la concentración de los metales en el medio de cultivo y una menor disponibilidad de estos para ser bioacumulados. La máxima concentración de Ni, tanto en hojas como en raíz, fue a los 21 días de exposición y luego no varió en el tiempo. Un comportamiento similar fue observado por Hadad et al. (2011) en *E. crassipes*, donde la máxima concentración se observó entre los 10 y 15 días de exposición. La máxima acumulación de Zn en hojas de *L. laevigatum* fue de 200 mg kg⁻¹ en la primera etapa de exposición y en la raíz fue de 738 mg kg⁻¹ en etapas tardías de exposición. Una situación similar citan para *E. crassipes* Hadad et al. (2011) donde la acumulación de la hoja no varió luego de las 24 hs pero sí en la raíz hasta los 15 días, a partir de cuyo tiempo se estabilizó.

El factor de bioconcentración (FBC) entendido como la capacidad que tiene la planta para bioacumular los metales que obtiene del medio, debe tener un valor mayor de 1000 para considerar a una especie como una buena acumuladora de metales (Zayed et al., 1998). Los resultados de este estudio reflejan que *L. laevigatum* es una buena acumuladora de Pb, Cr, Ni y Zn (Figura 9) y podría ser utilizada como potencial fitoextractora de metales en aguas contaminadas. Además según los FBC obtenidos, la raíz acumuló mayores cantidades que las hojas y la bioacumulación de Ni y Zn fue significativamente mayor a las de Pb y Cr.

L. laevigatum mostró niveles de FBC para Pb en hoja y en raíz de 499,55 y 1386,12, respectivamente, siendo más eficiente en la extracción de Pb que lo observado por Singh et al., (2010) en *Najas indica*, quienes utilizaron concentraciones de 2 mg L⁻¹ Pb y reportaron valores de FBC de 582 en todos los órganos de la planta acuática. El FBC para Cr fue para hojas y raíces de 440 y 1780 respectivamente, mayor a lo observado en *E. crassipes* para la hoja, con un FBC de 160 y menor a lo hallado por otros autores en raíces donde el FBC alcanzó un valor de 5600 (Hadad et al., 2011). Además, *L. laevigatum* mostró mayores valores de FBC a los reportados por un estudio donde se utilizaron hidrófitas como bioindicadores, encontrándose que a concentraciones de Cr de 1 mg kg⁻¹, el berro y *Verónica beccabunga* tienen un FBC < 1000 tanto en la raíz como en la parte aérea de la planta (Zurayk et al., 2001). Para Ni, *L. laevigatum* mostró niveles de FBC > 1000, en hoja fue de 2000 y en raíz fue de 6800. Un estudio realizado en *E. crassipes*, con concentraciones similares de Ni, informa menores valores del FBC, 1370 en la hoja y 2200 en la raíz (Liao y Chang, 2004).

El FBC para Zn en este estudio fue de 3300 y 11500, en hojas y raíces respectivamente, siendo más eficiente para la extracción de Zn que *E. crassipes* (Yapoga et al., 2013), y *C. demersum* (Umebese y Motajo, 2008).

El factor de translocación (FT), un indicador de la habilidad de la planta para transportar los metales desde las raíces a las hojas, considera que valores mayores a 1 indican una alta transferencia de metales (Soda et al., 2012). En *L. laevigatum* el FT para todos los metales fue menor a 1 lo que indicó una baja translocación de los metales desde la raíz a la hoja. Una situación similar fue observada para la transferencia de Cr y Ni en *N. officinale* y *V. becabunga* (Zurayk et al., 2001) y para la translocación de Pb y Zn en *E. crassipes* (Liao y Chang, 2004). Durante la exposición a la mezcla de metales en solución, *L. laevigatum* mostró una capacidad de translocación mayor para Pb que para Cr, Ni y Zn. Resultados similares fueron observados en plantas de *L. minor*, donde los niveles de translocación de Pb fueron significativamente mayores a los observados para Ni, Zn y Cr (Kastratović et al., 2015).

Efectos de la mezcla de los metales Cromo, Plomo, Níquel y Zinc sobre parámetros fisiológicos en Limnobium laevigatum

Limnobium laevigatum pudo tolerar niveles hasta 0,07 mg L⁻¹ de cada uno de los siguientes metales combinados Pb, Cr, Ni y Zn sin mostrar cambios significativos en los pigmentos fotosintéticos dentro de los primeros 14 días de exposición. A partir de concentraciones de 1 mg L⁻¹ de Pb y Cr, 0,5 mg L⁻¹ de Ni y 0,1 mg L⁻¹ de Zn, las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos clorofila a, feofitina a y carotenoides disminuyeron significativamente luego de 21 días de exposición. Resultados similares fueron encontrados en: *Najas indica* donde se registró una disminución de los pigmentos con el aumento de la concentración de Pb luego de 7 días de exposición (Singh et al., 2010); *Salvinia minima* con una disminución al 50 % de la clorofila y al 13 % de los carotenoides respecto al control, luego de ser expuesta durante una semana a concentraciones de Cr 1 mg L⁻¹ (Nichols et al., 2000); *Elodea canadensis* creciendo en un medio de cultivo con 2,93 mg L⁻¹ de Ni²⁺ donde se observó una disminución mayor al 30 % de los niveles de clorofila y carotenoides luego de 5 días (Maleva et al., 2009); *E. densa* expuesta a 0,15 mg L⁻¹ de Zn durante 7 días, donde se registró diferencias significativas respecto al control en el contenido de clorofilas y carotenoides (Harguinteguy, 2013). La relación feofitina a/clorofila a en *L. laevigatum* fue significativamente superior con la mayor concentración de metales utilizada. Dicha relación también aumenta en *E. densa* a medida que lo hace la concentración de Zn del medio de cultivo (Harguinteguy, 2013).

Numerosos estudios han demostrado que los metales pesados pueden reducir los niveles de pigmentos fotosintéticos y provocar la degradación de clorofilas (Mishra et al., 2006; Megateli et al., 2009). La disminución en el contenido de clorofilas en hojas de plantas tratadas con metales ha sido atribuida a alteraciones en la síntesis de este pigmento (Prasad y Strzałka, 1999), como así también al aumento de su degradación (Somashekaraiah, 1992). Algunos autores sostienen que muchos metales pesados (Hg, Cd, Cu, Ni, Zn, y Pb) desplazarían al átomo central de Mg de la clorofila en plantas que se encuentren afectadas por la presencia de estos (Prasad y Strzałka, 1999; Dhir et al., 2009). Dicha sustitución afectaría la estructura de la molécula de clorofila, la captación de luz y con ello la fotosíntesis. Otro mecanismo que se relaciona con

el descenso en la concentración de los pigmentos es el impedimento en la captación de elementos esenciales para la síntesis de éstos debido a daños en el aparato fotosintético (Sharma y Dubey, 2005) o por competencia con metales como el Zn (Wang et al., 2009). Un ejemplo de esto es la disminución de la captación de magnesio y nitrógeno en presencia de Cr, los cuales son componentes esenciales de la molécula de clorofila (Sela et al., 1989).

La peroxidación de lípidos en plantas es una consecuencia de daño oxidativo causado por subproductos de numerosas vías metabólicas en diferentes compartimentos celulares. Bajo estrés por metales, la peroxidación de lípidos puede iniciarse por medio de la oxidación de ácidos-grasos poliinsaturados de membranas formando compuestos como MDA (Wang et al., 2009). En este estudio, *L. laevigatum* presentó un aumento en la producción de MDA en raíz a medida que aumentaban las concentraciones de los metales en el medio de cultivo. Resultados similares se observaron en trigo, *Triticum aestivum*, expuesto a concentraciones de Cr de 0,05 mg L⁻¹ y 0,065 Zn mg L⁻¹ (Panda et al., 2003). También en algunas macrófitas se citan aumento de los niveles de MDA a concentraciones más elevadas de metales que 0,07 mg L⁻¹ utilizados en este estudio: *Hydrilla verticillata* varía la concentración de MDA respecto al control a concentraciones de Zn 10 mg L⁻¹ (Wang et al., 2009); *Najas indica* registró un aumento de MDA a partir de los 0,2 mg L⁻¹ Pb (Singh et al., 2010). Sin embargo, en *L. laevigatum* la concentración de MDA disminuyó en el tratamiento de mayor concentración, lo mismo que ocurre en los géneros *Ceratophyllum*, *Hydrilla* y *Wolffia* donde se registró una disminución de MDA en los tratamientos con mayor concentración de metales (Dhir et al., 2004; Gupta y Karuppiyah, 1996). El hecho de que a la mayor exposición de metales el MDA sea igual al control, podría estar relacionado con eficientes mecanismos de defensa contra los radicales libres en estas especies.

Respecto al tiempo de exposición a metales, en la primera semana no se registró un incremento de MDA, recién esto ocurrió a los 14 días de exposición, similar a lo que descripto en *H. verticillata* que varía la concentración de MDA respecto al control a concentraciones de Ni de 1,5 mg L⁻¹ luego de 6 días de exposición (Sinha y Pandey, 2003). Estos autores proponen que los bajos niveles de MDA en tiempos tempranos podría deberse a la estimulación de la capacidad reductora del tejido vegetal a partir del incremento del contenido de sulfhidrilos, lo que protege a la membrana del ataque oxidativo de EROS.

Si bien la actividad fotosintética en *L. laevigatum* disminuyó en los tratamientos de mayores concentraciones de metales pesados, esta especie mostró cierto grado de tolerancia al estrés oxidativo en los mismos tratamientos ya que no se observaron cambios en los productos de peroxidación de lípidos de membranas. Este tipo de respuestas fueron observadas también en *M. aquaticum* expuesta a concentraciones crecientes de metales durante 7 días de exposición (Harguinteguy, 2013).

CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en el presente trabajo constituyen el primer reporte de acumulación y efectos tóxicos de Pb, Cr, Ni y Zn en la especie macrófita *Limnobium laevigatum*.

En general, la acumulación de los metales en *L. laevigatum* fue incrementando a concentraciones crecientes de estos en el medio de cultivo y con el tiempo de exposición.

Pb, Cr, Ni y Zn causaron cambios fisiológicos en la macrófita flotante, sin embargo los daños a nivel del sistema fotosintético y de la formación de productos de peroxidación de lípidos de membranas no representan un daño para la supervivencia de la especie en etapas intermedias de exposición a los metales. La bioacumulación de Pb, Cr, Ni y Zn fue mayor en las raíces que en las hojas y por sus altos niveles de acumulación, aun cuando es expuesta a bajas concentraciones de metales, se la puede considerar una especie hiperacumuladora de Zn y Ni.

Teniendo en cuenta la capacidad de acumulación y su nivel de tolerancia, *L. laevigatum* es una especie de interés para su uso en fitorremediación de aguas contaminadas con niveles moderados de metales y en las primeras semanas de exposición.

REFERENCIAS

- Ali, B., Hayat, S., Fariduddin, Q., y Ahmad, A. (2008). Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in *Brassica juncea*. *Chemosphere*, 72(9), 1387-1392.
- Apel, K., y Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Aponte, H., y Pacherras, C. O. (2013). Crecimiento y propagación de *Limnobium laevigatum* (Hydrocharitaceae) bajo diferentes concentraciones de nutrientes. *Biologist*, 11(1), 69-78.
- Argentina, R. (1991). *Ley Nacional 24.051 y Decreto Reglamentario 831/93* que regulan la generación, manipulación, transporte, tratamiento y disposición final de residuos peligrosos.
- Assunção, A. G., Schat, H., y Aarts, M. G. (2003). *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 159(2), 351-360.
- Cañas, M. S., Carreras, H. A., Orellana, L., y Pignata, M. L. (1997). Correlation between environmental conditions and foliar chemical parameters in *Ligustrum lucidum* Ait. Exposed to urban air pollutants. *Journal of Environmental Management*, 49(2), 167-181.
- Castillo, P. A. M., Acuna, L. G. N., y Miranda, J. P. R. (2012). Evaluación de un humedal artificial de flujo superficial con *Limnobium laevigatum* para el tratamiento de aguas residuales combinadas (domésticas y pecuarias) en Bogotá. *Tecno ambiente: Revista profesional de tecnología y equipamiento de ingeniería ambiental*, 22(232), 9-16.
- Cook, C. D., y Urmi-König, K. (1983). A revision of the genus *Limnobium* including *Hydromystria* (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany*, 17(1), 1-27.
- Choi, J. H., Park, S. S., y Jaffé, P. R. (2006). The effect of emergent macrophytes on the dynamics of sulfur species and trace metals in wetland sediments. *Environmental Pollution*, 140(2), 286-293.
- Dhir, B., Sharmila, P., y Saradhi, P. P. (2004). Hydrophytes lack potential to exhibit cadmium stress induced enhancement in lipid peroxidation and accumulation of proline. *Aquatic Toxicology*, 66(2), 141-147.
- Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P. P., y Nasim, S. A. (2009). Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6), 1790-1797.
- Dirección Provincial de Agua y Saneamiento (DiPAS – provincia de Córdoba) (*Resolución 415/99*),
- Duman, F., Leblebici, Z., y Aksoy, A. (2009). Growth and bioaccumulation characteristics of watercress (*Nasturtium officinale*) exposed to cadmium, cobalt and chromium. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 21(4), 257-265.
- Fernández-Cirelli, A., y du Mortier, C. (2005). Evaluación de la condición del agua para consumo humano en Latinoamérica. Tecnologías solares para la desinfección y descontaminación del agua. *Solar Safe Water*, 11-26.
- Förstner, U., y Wittmann, G. (1983). *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- Franzaring, J., Klumpp, A., y Fangmeier, A. (2007). Active biomonitoring of airborne fluoride near an HF producing factory using standardised grass cultures. *Atmospheric Environment*, 41(23), 4828-4840.

- Fu, J., Hu, X., Tao, X., Yu, H., y Zhang, X. (2013). Risk and toxicity assessments of heavy metals in sediments and fishes from the Yangtze River and Taihu Lake, China. *Chemosphere*.
- Garbisu, C., y Alkorta, I. (2001). Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*, 77(3), 229-236.
- García Vargas, D., Barceló Coll, J., y Gunsé Forcadell, B. (2007). Efectos fisiológicos y compartimentación radicular en plantas de *Zea mays* L. expuestas a la toxicidad por plomo: *Universitat Autònoma de Barcelona*.
- Giere, O., Eleftheriou, A., y Murison, D. J. (1988). Abiotic Factors. In R. P. Higgins & H. Thiel (Eds.), Introduction to the study of meiofauna (pp. 61-78). Washington, D.C., London: *Smithsonian Institution Press*.
- Greger, M., Kautsky, L., y Sandberg, T. (1995). A tentative model of Cd uptake in *Potamogeton pectinatus* in relation to salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 35(2), 215-225.
- Gupta, G., y Karupiah, M. (1996). Heavy metals in sediments of two Chesapeake Bay tributaries—Wicomico and Pocomoke Rivers. *Journal of Hazardous materials*, 50(1), 15-29.
- Gupta, M., y Chandra, P. (1994). Lead accumulation and toxicity in *Vallisneria spiralis*(L.) and *Hvdrilla vertieillata* (lf) Royle. *Journal of Environmental Science & Health Part A*, 29(3), 503-516.
- Hadad, H. R., Maine, M. A., Mufarrije, M. M., Del Sastre, M. V., y Di Luca, G. A. (2011). Bioaccumulation kinetics and toxic effects of Cr, Ni and Zn on *Eichhornia crassipes*. *Journal of Hazardous materials*, 190(1-3), 1016-1022.
- Harguinteguy, C. A. (2013). Evaluación de los niveles de metales pesados y elementos traza en cursos de aguas superficiales de la provincia de Córdoba. Detección y calibración de especies bioindicadoras. (PhD), *UNC*.
- Harguinteguy, C. A., Fernández-Cirelli, A., y Pignata, M. L. (2014). Heavy metal accumulation in leaves of aquatic plant *Stuckenia filiformis* and its relationship with sediment and water in the Suquia river (Argentina). *Microchemical Journal*, 114, 111-118.
- Harguinteguy, C. A., Schreiber, R., y Pignata, M. L. (2012). *Myriophyllum aquaticum* as a biomonitor of water heavy metal input related to agricultural activities in the Xanaes River (Córdoba, Arg). *Ecological Indicators*, 27(0), 8-16.
- Heath, R. L., y Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198.
- Hernandez, A., y Rincon, S. (2014). Capacidad fitorremediadora del Buchón de Agua (*Limnobium laevigatum*) mediante la evaluación de la adsorción del cromo trivalente. *Fundación Universitaria Agraria de Colombia*.
- Kara, Y. (2005). Bioaccumulation of Cu, Zn and Ni from the wastewater by treated *Nasturtium officinale*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2(1), 63-65.
- Kastratović, V., Jaćimović, Ž., Đurović, D., Bigović, M., y Krivokapić, S. (2015). *Lemna minor* as bioindicator of heavy metal pollution in Skadar Lake (Montenegro).
- Liao, S.-W., y Chang, W.-L. (2004). Heavy metal phytoremediation by water hyacinth at constructed wetlands in Taiwan. *Photogrammetric Engineering and Remote Sensing*, 54, 177-185.
- Maine, M. a. A., Suñé, N. L., y Lagger, S. C. (2004). Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Research*, 38(6), 1494-1501.
- Maleva, M. G., Nekrasova, G. F., Malec, P., Prasad, M. N. V., y Strzałka, K. (2009). Ecophysiological tolerance of *Elodea canadensis* to nickel exposure. *Chemosphere*, 77(3), 392-398.
- Megateli, S., Semsari, S., y Couderchet, M. (2009). Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by *Lemna gibba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6), 1774-1780.
- Metwally, A., Safronova, V. I., Belimov, A. A., y Dietz, K.-J. (2005). Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *Journal of Experimental Botany*, 56(409), 167-178.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Kumar, R., Seth, C. S., y Gupta, D. K. (2006). Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, 65(6), 1027-1039.
- Mishra, V. K., y Tripathi, B. (2008). Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource Technology*, 99(15), 7091-7097.
- Monferrán, M. V., Pignata, M. L., y Wunderlin, D. A. (2012). Enhanced phytoextraction of chromium by the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus* in presence of copper. *Environmental Pollution*, 161, 15-22.
- Nekrasova, G., Ushakova, O., Ermakov, A., Uimin, M., y Byzov, I. (2011). Effects of copper(II) ions and copper oxide nanoparticles on *Elodea densa* Planch. *Russian Journal of Ecology*, 42(6), 458-463.

- Nichols, P. B., Couch, J. D., y Al-Hamdani, S. H. (2000). Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. *Aquatic Botany*, 68(4), 313-319.
- Olguín, E. J., y Sánchez-Galván, G. (2012). Heavy metal removal in phytofiltration and phycoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *New Biotechnology*, 30(1), 3-8.
- Ozturk, F., Duman, F., Leblebici, Z., y Temizgul, R. (2010). Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environmental and Experimental Botany*, 69(2).
- Panda, S., Chaudhury, I., y Khan, M. (2003). Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biologia Plantarum*, 46(2), 289-294.
- Passow, H., Rothstein, A., y Clarkson, T. (1961). The general pharmacology of the heavy metals. *Pharmacol. Revs.*, 13.
- Prasad, M. N. V., y Strzałka, K. (1999). Impact of heavy metals on photosynthesis. In M. N. V. Prasad & J. Hagemeyer (Eds.), *Heavy Metal Stress in Plants-From Molecules to Ecosystems* (pp. 117-138.). Berlin: Springer.
- Samecka-Cymerman, A., y Kempers, A. (2004). Toxic metals in aquatic plants surviving in surface water polluted by copper mining industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(1), 64-69.
- Sela, M., Garty, J., y Telor, E. (1989). The accumulation and the effect of heavy metals on the water fern *Azolla filiculoides*. *New Phytologist*, 112(1), 7-12.
- Sharma, P., y Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 35-52.
- Shinn, C., Dauba, F., Grenouillet, G., Guenard, G., y Lek, S. (2009). Temporal variation of heavy metal contamination in fish of the river lot in southern France. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7), 1957-1965.
- Singh, R., Tripathi, R. D., Dwivedi, S., Kumar, A., Trivedi, P. K., y Chakrabarty, D. (2010). Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. *Bioresource Technology*, 101(9), 3025-3032.
- Sinha, S., y Pandey, K. (2003). Nickel Induced Toxic Effects and Bioaccumulation in the Submerged Plant, *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle Under Repeated Metal Exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71(6), 1175-1183.
- Soda, S., Hamada, T., Yamaoka, Y., Ike, M., Nakazato, H., Saeki, Y., Kasamatsu, T., y Sakurai, Y. (2012). Constructed wetlands for advanced treatment of wastewater with a complex matrix from a metal-processing plant: bioconcentration and translocation factors of various metals in *Acorus gramineus* and *Cyperus alternifolius*. *Ecological Engineering*, 39, 63-70.
- Stewart, R. R., y Bewley, J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, 65(2), 245-248.
- Umebese, C. E., y Motajo, A. F. (2008). Accumulation, tolerance and impact of Al, Cu and Zn on growth and nitrate reductase activity of *Ceratophyllum demersum* (Hornwort). *Journal of Environmental Biology*, 29(2), 197-200.
- Vangronsveld, J., y Clijsters, H. (1994). Toxic Effects of Metals. Plants and the chemical elements: biochemistry, uptake, tolerance and toxicity, 149.
- Vesely, T., Tlustos, P., y Száková, J. (2011). The use of water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) for rhizofiltration of a highly polluted solution by cadmium and lead. *International Journal of Phytoremediation*, 13(9), 859-872.
- Wang, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Qian, J., Hou, J., Zhang, W. J., y Lu, J. (2009). Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Chemosphere*, 76(7), 938-945.
- Wetzel, R. M. (2001). *Limnology - Lake and River Ecosystems* (Third ed.). San Diego, California, USA: Elsevier.
- Wintermans, J. F. G. M., y De Mots, A. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta - Biophysics including Photosynthesis*, 109(2), 448-453.
- Yapoga, S., Ossey, Y. B., y Kouame, V. (2013). Phytoremediation of zinc, cadmium, copper and chrome from industrial wastewater by *Eichhornia crassipes*. *International Journal of Conservation Science*, 4(1).
- Zayed, A., Gowthaman, S., y Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*, 27(3), 715-721.
- Zurayk, R., Sukkariyah, B., y Baalbaki, R. (2001). Common hydrophytes as bioindicators of nickel, chromium and cadmium pollution. *Water, Air, and Soil Pollution*, 127(1-4), 373-388.