

## CAPÍTULO 2:

### Tolerancia de las macrófitas flotantes

## 2.1. Introducción:

En el humedal construido a escala reducida se observó la desaparición paulatina de las macrófitas flotantes primero y de las emergentes con posterioridad, permaneciendo al final del primer año solo *T. domingensis*, la que alcanzó importantes valores de biomasa, mayores que en humedales naturales de la zona. Como se discutió anteriormente, las concentraciones de metales en la biomasa de las plantas y en el agua fueron menores a las de otros trabajos citados en la bibliografía, sugiriendo que la concentración de metales no sería la principal causa de la desaparición de las macrófitas. El afluente del humedal registró elevados valores de conductividad y pH. Por ese motivo, se realizaron experimentos en los que se estudió la tolerancia de las especies flotantes que se utilizaron en el ensayo a campo en escala reducida a distintos valores de pH, conductividad, Cr, Ni y Zn, con el objeto de determinar qué factores limitan el desarrollo de las macrófitas en el humedal construido.

Complementariamente, en este capítulo se plantea la hipótesis de que el enriquecimiento con nutrientes aumenta la tolerancia de las macrófitas flotantes a los metales, lo cual permitiría un mayor desarrollo de estas especies en humedales construidos que posean concentraciones de metales que puedan inhibir el crecimiento vegetal.

## 2.2. Metodología desarrollada:

El agua y las plantas utilizadas en los experimentos se colectaron en un ambiente natural de la llanura de inundación del Río Paraná Medio, Argentina. Las características físico químicas del agua del ambiente natural a lo largo del período donde se llevaron a cabo los distintos experimentos se muestran en la Tabla 2.1 (n= 6). Se recolectaron plantas en buenas condiciones y con similar estado de crecimiento, longitud de raíces y color de hojas. Después de su recolección, se lavaron y se aclimataron durante 48 h en invernadero. Se utilizaron acuarios plásticos de 10 litros de capacidad dispuestos por triplicado en invernadero para mantener un fotoperíodo natural durante el tiempo de experimentación (Fig. 2.1).

En todos los experimentos se midió el peso seco de las partes aéreas (hojas) y sumergidas (raíces y tallos), colocándolas en estufa a 105°C hasta peso constante (Westlake, 1974; APHA, 1998) y se calcularon las tasas de crecimiento relativo. Dichas tasas se calcularon según la ecuación (3).

Tabla 2.1. Parámetros físico-químicos medidos en el agua del ambiente natural donde se colectaron el agua y las plantas utilizadas en los experimentos de tolerancia (ND = no detectado, los valores entre paréntesis corresponden a los límites de detección del método).

Parámetro	Media	Mín./Máx.
Conductividad ( $\text{mS cm}^{-1}$ )	0,118	0,103/0,135
pH	6,5	6,1/6,8
OD ( $\text{mg l}^{-1}$ )	8,2	6,7/9,0
Calcio ( $\text{mg l}^{-1}$ )	7,0	5,0/8,9
Sodio ( $\text{mg l}^{-1}$ )	26,5	24,1/29,1
Potasio ( $\text{mg l}^{-1}$ )	2,15	1,7/2,6
Magnesio ( $\text{mg l}^{-1}$ )	3,60	3,0/4,2
Bicarbonato ( $\text{mg l}^{-1}$ )	58,0	54,3/62,8
Sulfato ( $\text{mg l}^{-1}$ )	8,60	6,6/10,4
N-Nitrato ( $\text{mg l}^{-1}$ )	0,101	0,06/0,17
N-Nitrito ( $\text{mg l}^{-1}$ )	0,009	0,006/0,010
N-Amonio ( $\text{mg l}^{-1}$ )	0,486	0,35/0,58
PRS ( $\text{mg l}^{-1}$ )	0,056	0,049/0,061
Cromo ( $\text{mg l}^{-1}$ )	ND (0,001)	-
Níquel ( $\text{mg l}^{-1}$ )	ND (0,003)	-
Zinc ( $\text{mg l}^{-1}$ )	ND (0,025)	-



Fig. 2.1. Vista de los acuarios utilizados en la realización de los experimentos de invernadero.

## 2.2.1. Diseño de los experimentos:

### 2.2.1.1. Experimentos de tolerancia a la salinidad y pH:

Se estudiaron las especies *S. herzogii*, *P. stratiotes* y *E. crassipes*. Estas especies se incubaron en agua con conductividades de 2, 3, 4, 6 y 8 mS cm<sup>-1</sup>. Estos valores fueron alcanzados agregando soluciones de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al agua del ambiente natural. Se eligió esta sal, debido a que los iones Na<sup>+</sup> y sulfato fueron los mayoritarios en el afluyente del humedal construido a escala reducida. Los controles con agua del ambiente natural no recibieron agregado alguno. En los experimentos de pH, los vegetales se expusieron a valores de 8, 9, 10 y 11. Dichos valores se obtuvieron agregando NaOH al agua hasta ajustar los diferentes valores. Se utilizaron acuarios control que mantuvieron el valor de pH del ambiente natural.

Los experimentos de pH y conductividad se realizaron durante la primavera en un invernadero con iluminación natural a una temperatura media de 28°C y tuvieron una duración de 8 días.

En los experimentos de *P. stratiotes* y *S. herzogii* se colocaron 20 g de plantas frescas y 3 L de agua en cada acuario. En los experimentos de *E. crassipes* y debido a su mayor porte, se colocó una planta (80 ± 10 g peso fresco) y 5 L de agua en cada acuario. Se utilizaron plantas de similar tamaño (altura = 17 ± 3 cm; longitud de raíces = 14 ± 5 cm). Se realizaron registros visuales del grado de marchitamiento y clorosis. Los valores de pH y conductividad fueron mantenidos constantes a lo largo del tiempo con el agregado de NaOH y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido cuando fue necesario.

### 2.2.1.2. Experimentos de tolerancia al Zn, Ni y Cr:

Se realizó un experimento para cada metal por separado en los que se midió la tasa de crecimiento relativo de *S. herzogii* expuesta a concentraciones de Cr, Ni y Zn de 4, 6, 8 y 10 mg l<sup>-1</sup>. Se utilizaron acuarios control con agua del sitio de recolección sin el agregado de metales.

### 2.2.1.3. Experimentos de la influencia del enriquecimiento con nutrientes sobre la tolerancia al Zn, Ni y Cr:

Se realizó un experimento para cada metal. Se comparó la tasa de crecimiento de tratamientos expuestos al metal y tratamientos con metal enriquecidos con nutrientes hasta lograr una concentración inicial de 5 mg l<sup>-1</sup> de PRS (como H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>), 5 mg l<sup>-1</sup> de N-Nitrato (como NO<sub>3</sub>K) y 5 mg l<sup>-1</sup> N-Amonio (como NH<sub>4</sub>Cl). Se estudiaron tres concentraciones para cada metal según el siguiente esquema:

Tratamientos 1, 2 y 3: concentraciones de metal (1), (2) y (3)

Tratamiento 4: control, sin agregado de metal

Tratamientos 5, 6 y 7: concentraciones de metal (1), (2) y (3) con enriquecimiento simultáneo de nutrientes

Tratamiento 8: control sin agregado de metal y enriquecimiento simultáneo de nutrientes

Las concentraciones (1), (2) y (3) fueron diferentes para cada metal estudiado y se eligieron de acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores. Las concentraciones utilizadas fueron de 10, 11 y 12 mg Zn l<sup>-1</sup>; 2, 3 y 4 mg Ni l<sup>-1</sup> y 5, 6 y 7 mg Cr l<sup>-1</sup>.

Todos los experimentos con metales pesados tuvieron una duración de 11 días. En todos los acuarios el pH se mantuvo a un valor comprendido entre 5 y 6 agregando HCl. Se determinaron las concentraciones de clorofila, PT, NTK y del metal utilizado en cada tratamiento en hojas y raíces al iniciar y finalizar los experimentos. Se determinaron las concentraciones en agua de PRS, nitrato, amonio y del metal utilizado durante el transcurso de los experimentos.

### 2.2.2. Determinaciones analíticas:

Se utilizaron las mismas técnicas analíticas que en el ensayo a campo en escala reducida (Capítulo 1). La concentración de clorofila se determinó extrayendo dicho pigmento con acetona durante 48 h en condiciones de oscuridad y frío (3-5°C). El porcentaje de transmitancia de los extractos se leyó a longitudes de onda de 645 y 665 nm con un espectrofotómetro UV-Vis a fin de calcular la concentración de clorofila *a* (Westlake, 1974).

### 2.2.3. Análisis estadístico:

Se realizaron análisis de la varianza de un factor para determinar las diferencias significativas entre las tasas de crecimiento relativo, concentraciones de clorofila, PT, NTK y metales en tejidos vegetales (hojas y raíces) de los distintos tratamientos aplicados en los experimentos de conductividad, pH y metales pesados. El test de Duncan se utilizó para diferenciar medias donde fue necesario. Un nivel de  $p < 0,05$  se utilizó en todas las comparaciones. La normalidad de los residuales se analizó gráficamente. Se utilizó el test de Bartlett para homocedasticidad, para corroborar si las variancias fueron homogéneas (Pérez, 1998; Walpole et al., 1999). En los experimentos definitivos de tolerancia a Cr, Ni y Zn se utilizó un test de comparación de medias pareadas para comparar los porcentajes de remoción de metales de agua entre los tratamientos con y sin agregado de nutrientes. Se realizaron análisis de regresión lineal simple para relacionar las concentraciones iniciales de metales en agua con las concentraciones finales de metales en raíces y hojas, tanto en los tratamientos con agregado de metal como en los que se agregó el metal y se enriquecieron con nutrientes. Los cálculos se efectuaron utilizando el software Statgraphics Plus 3.0.

### 2.3. Resultados:

#### 2.3.1. Experimentos de tolerancia a la salinidad y pH:

Se registraron efectos significativos de la salinidad sobre el crecimiento de *E. crassipes* (Fig. 2.2). Las plantas sometidas a valores de  $4 \text{ mS cm}^{-1}$  o mayores mostraron diferencias significativas con los controles, mientras que a valores de 2 y  $3 \text{ mS cm}^{-1}$  no se produjeron diferencias significativas. Las plantas sometidas a valores de conductividad de 6 y  $8 \text{ mS cm}^{-1}$  presentaron secreciones salinas sobre sus pecíolos al finalizar la experiencia. El umbral de daño estaría en el rango  $2-4 \text{ mS cm}^{-1}$ . A valores de pH 10 y 11, el crecimiento fue significativamente menor que el del control (Fig. 2.3). Los otros valores de pH ensayados (8 y 9) no causaron efectos significativos sobre el crecimiento. A valores de pH 10 y 11 y conductividad de 4, 6 y  $8 \text{ mS cm}^{-1}$  *E. crassipes* mostró signos visibles de clorosis y marchitamiento.

*P. stratiotes* registró diferencias significativas con los controles a valores de conductividad de  $8 \text{ mS cm}^{-1}$  y pH 11. En estos tratamientos se observaron signos de clorosis y marchitamiento (Fig. 2.4a). *S. herzogii* no mostró diferencias significativas entre el control y

los diferentes tratamientos de salinidad aplicados, pero sí presentó diferencias entre las tasas de crecimiento del tratamiento a pH 11 y los demás. En los tratamientos de salinidad se observaron secreciones salinas en los bordes de las hojas de *S. herzogii* al finalizar la experiencia (Fig. 2.4b).

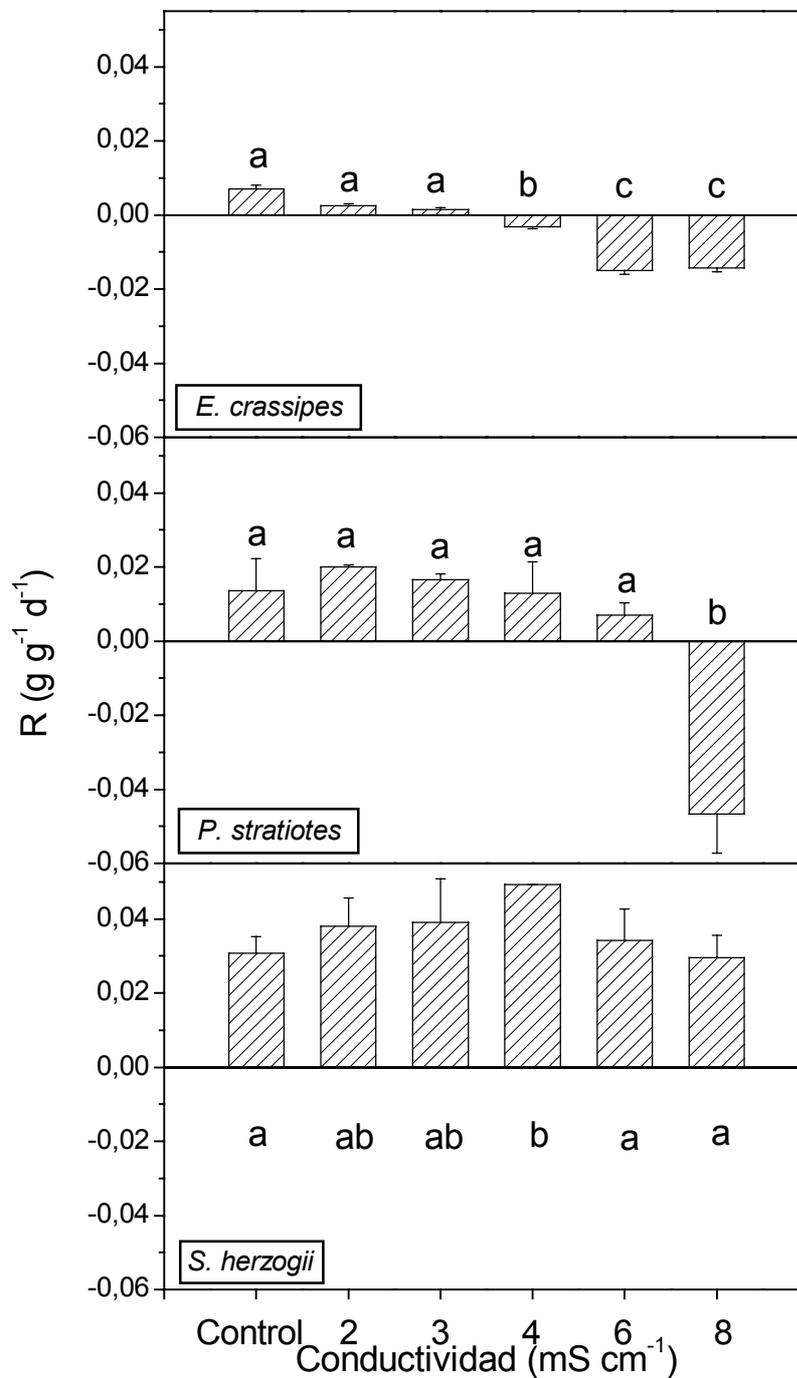


Fig. 2.2. Efectos de la salinidad sobre las tasas de crecimiento relativo (R) de *E. crassipes*, *P. stratiotes* y *S. herzogii* obtenidas en las experiencias de invernadero. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

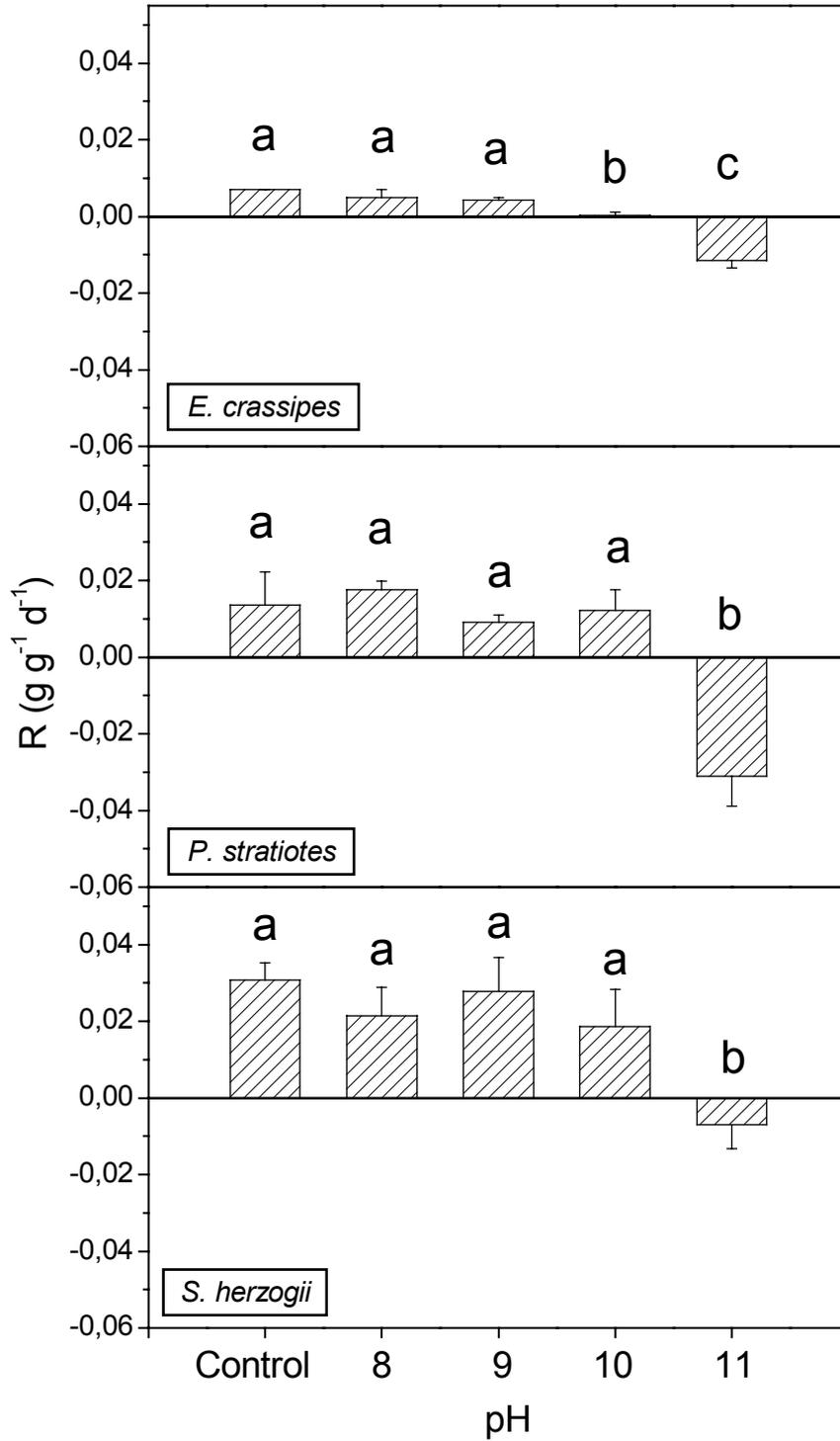


Fig. 2.3. Efectos del pH sobre las tasas de crecimiento relativo (R) de *E. crassipes*, *P. stratiotes* y *S. herzogii* obtenidas en las experiencias de invernadero. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

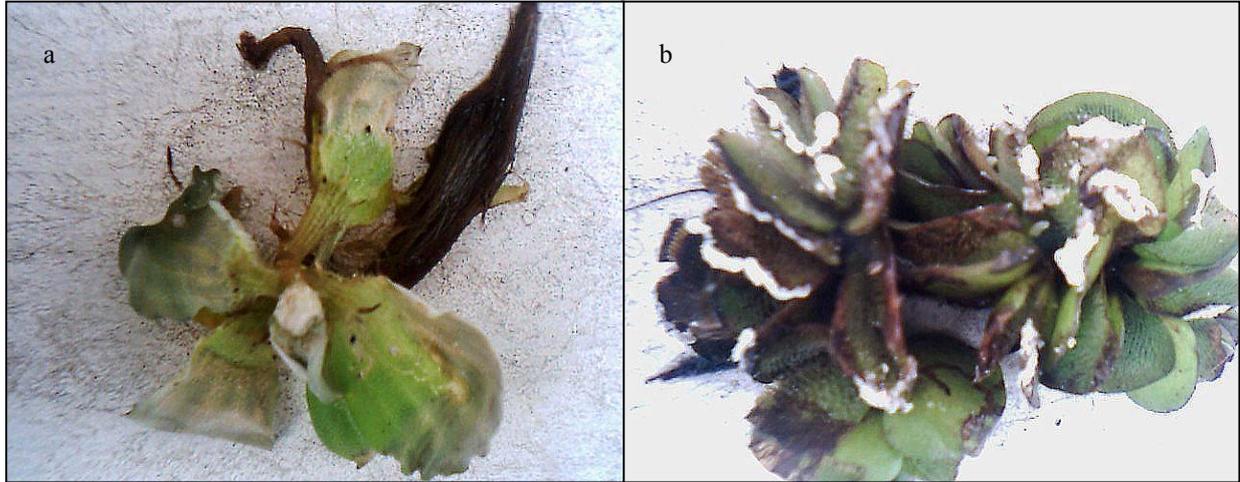


Fig. 2.4. Aspecto que presentaron *P. stratiotes* (a) y *S. herzogii* (b) al finalizar las experiencias de conductividad en el tratamiento a  $8 \text{ mS cm}^{-1}$ . Pueden apreciarse los efectos sobre la biomasa de *P. stratiotes*, mientras que en *S. herzogii* se observan secreciones salinas sobre las frondes pero no efectos sobre su biomasa.

### 2.3.2. Experimentos de tolerancia al Zn, Ni y Cr:

Estos experimentos mostraron diferencias en los umbrales de toxicidad a los distintos metales utilizados (Fig. 2.5). Las tasas de crecimiento relativo fueron significativamente diferentes entre el control y los tratamientos de  $6 \text{ mg Cr l}^{-1}$ ,  $10 \text{ mg Zn l}^{-1}$  y todas las concentraciones de Ni aplicadas (mínima  $4 \text{ mg l}^{-1}$ ). La Fig. 2.6 muestra la concentración de clorofila a lo largo del tiempo en los distintos tratamientos aplicados. En el caso del Zn, si bien el umbral de daño para el crecimiento fue de  $10 \text{ mg l}^{-1}$ , las concentraciones de clorofila fueron inferiores al control en todos los tratamientos.

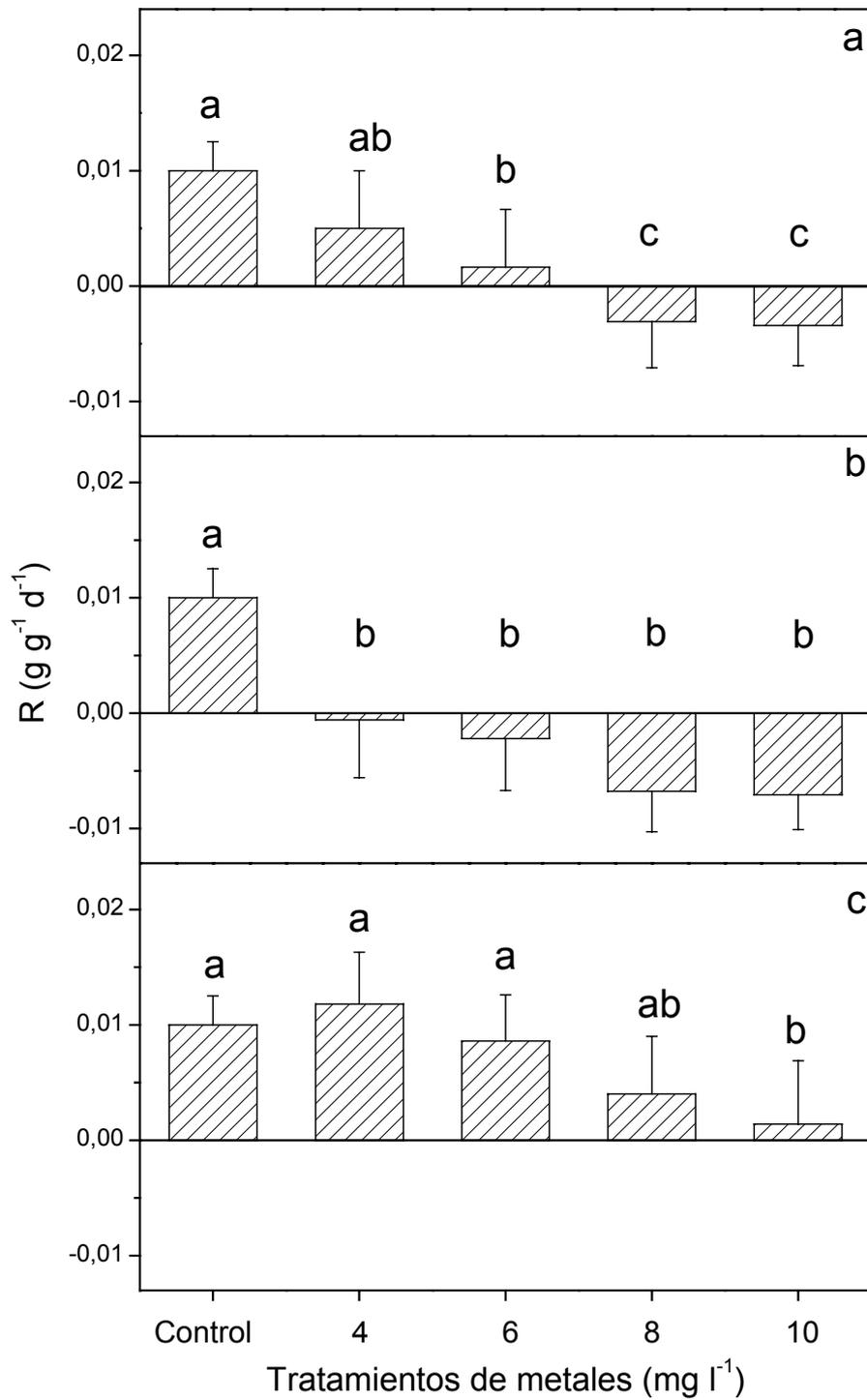


Fig. 2.5. Tasas de crecimiento relativo (R) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos de Cr (a), Ni (b) y Zn (c) aplicados en las experiencias preliminares. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

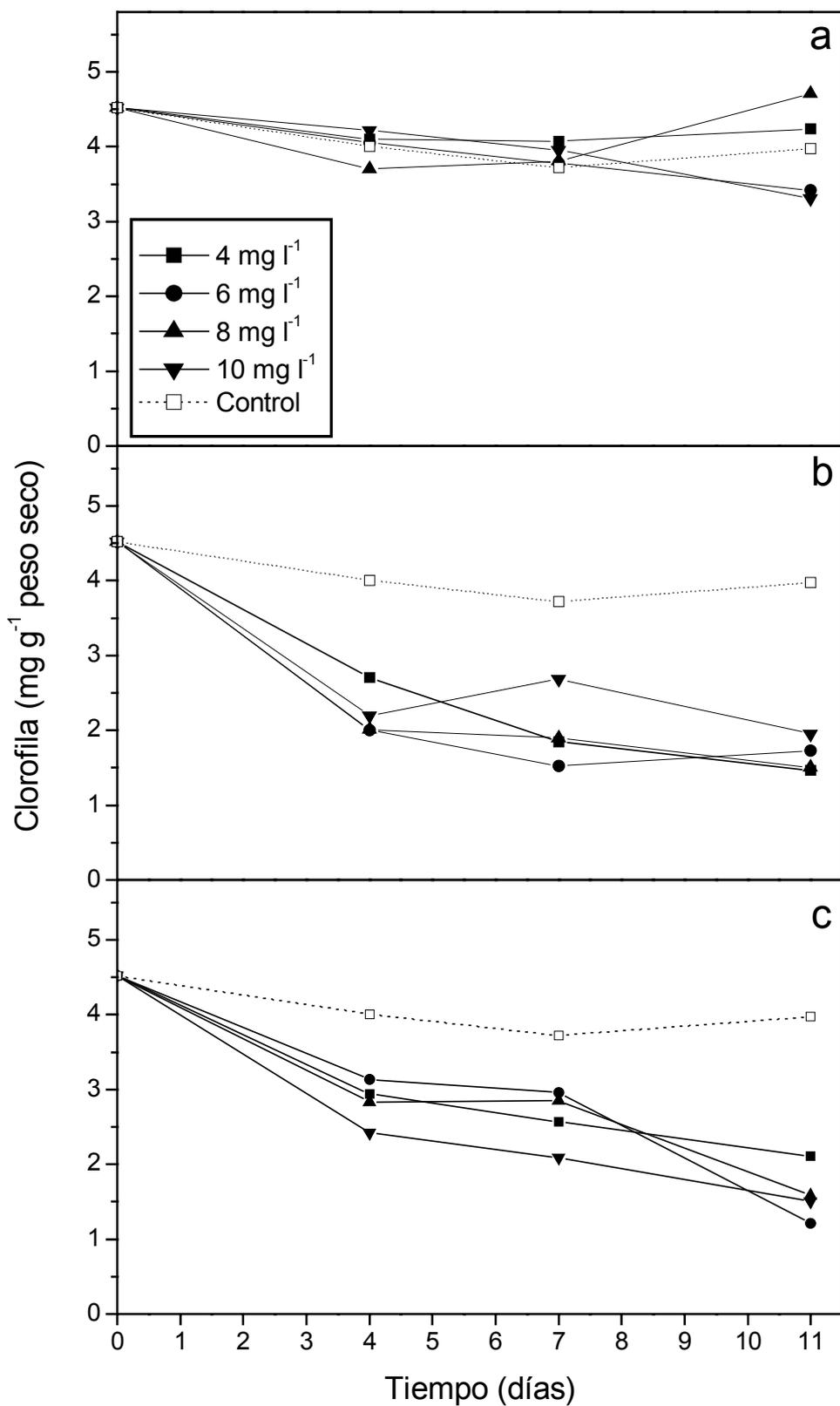


Fig. 2.6. Concentraciones de clorofila de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos de Cr (a), Ni (b) y Zn (c) aplicados en las experiencias preliminares.

### 2.3.3. Efecto del enriquecimiento con nutrientes sobre la toxicidad al Zn:

Para las tres concentraciones de Zn ensayadas, los tratamientos enriquecidos con nutrientes mostraron tasas de crecimiento relativo significativamente mayores que las de los tratamientos que no fueron enriquecidos con nutrientes (Fig. 2.7). Las tasas de crecimiento relativo en los tratamientos enriquecidos con nutrientes no fueron estadísticamente diferentes que las obtenidas en los controles, mientras que las tasas de crecimiento relativo obtenidas en los tratamientos expuestos a distintas concentraciones de Zn sin enriquecimiento con nutrientes fueron significativamente inferiores que las de los controles. La biomasa de raíces fue significativamente inferior en los tratamientos con exposición al Zn en comparación con la obtenida en los controles y tratamientos enriquecidos con nutrientes (Tabla 2.2). Las concentraciones de Zn en tejidos vegetales de los controles se encontraron por debajo de los límites de detección del método. Las concentraciones de Zn en raíces fueron significativamente mayores que las de las hojas. Las concentraciones de Zn en hojas fueron significativamente mayores en la exposición de Zn más alta (Fig. 2.8). Una tendencia similar pero no estadísticamente significativa, fue registrada en las concentraciones de Zn de raíces. Para cada concentración de metal ensayada los tratamientos enriquecidos con nutrientes registraron concentraciones de Zn en hojas significativamente inferiores que la de los tratamientos sin enriquecimiento con nutrientes, mientras que las concentraciones registradas en las raíces no fueron estadísticamente diferentes (Fig. 2.8). Las concentraciones de Zn en agua disminuyeron a lo largo del tiempo, siendo constantes después del cuarto día de experimentación (Fig. 2.9). Las concentraciones de Zn en agua fueron significativamente inferiores en los tratamientos enriquecidos con nutrientes en comparación con los tratamientos sin enriquecimiento. Las concentraciones de PRS y amonio en agua disminuyeron a lo largo del tiempo en los tratamientos enriquecidos (Fig. 2.10), alcanzando concentraciones significativamente inferiores en los controles en comparación con los tratamientos con agregado de Zn. La concentración de nitrato no mostró variaciones significativas. El enriquecimiento con nutrientes produjo un aumento de la concentración de P en hojas y raíces (Fig. 2.11). En los tratamientos sin adición de nutrientes, las concentraciones de P en hojas fueron significativamente mayores que las de las raíces, mientras que en los tratamientos con enriquecimiento de nutrientes, dichas concentraciones fueron significativamente mayores en raíces. La concentración de NTK fue significativamente mayor en hojas que en raíces (Fig. 2.12). La concentración de clorofila en el control con agregado de nutrientes se vio aumentada

con el enriquecimiento con nutrientes, mientras que la exposición al Zn y al Zn + nutrientes redujo la concentración de clorofila (Fig. 2.13).

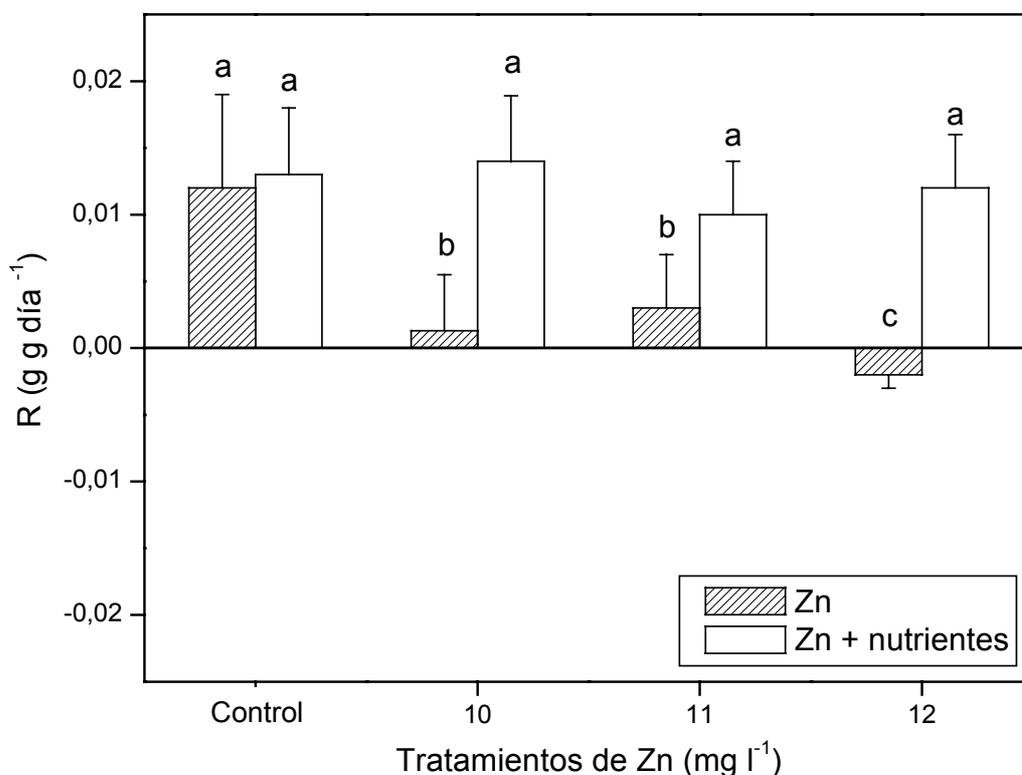


Fig. 2.7. Tasas de crecimiento relativo (R) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Zn definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

Tabla 2.2. Biomasa de raíces (g peso seco) obtenida en los experimentos definitivos de Zn, Ni y Cr (media  $\pm$  desvío estándar). Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Experimento de Zn		Experimento de Ni		Experimento de Cr	
Inicial	0,533 $\pm$ 0,021 a	Inicial	0,813 $\pm$ 0,097 a	Inicial	0,721 $\pm$ 0,072 a
10 mg l <sup>-1</sup>	0,510 $\pm$ 0,029 a	2 mg l <sup>-1</sup>	0,657 $\pm$ 0,008 b	5 mg l <sup>-1</sup>	0,354 $\pm$ 0,031 b
11 mg l <sup>-1</sup>	0,497 $\pm$ 0,057 a	3 mg l <sup>-1</sup>	0,857 $\pm$ 0,054 a	6 mg l <sup>-1</sup>	0,378 $\pm$ 0,039 bc
12 mg l <sup>-1</sup>	0,509 $\pm$ 0,036 a	4 mg l <sup>-1</sup>	0,693 $\pm$ 0,004 ba	7 mg l <sup>-1</sup>	0,423 $\pm$ 0,025 c
Control	0,687 $\pm$ 0,018 b	Control	0,848 $\pm$ 0,030 a	Control	0,609 $\pm$ 0,013 d
10 mg l <sup>-1</sup> + nut.	0,617 $\pm$ 0,024 bc	2 mg l <sup>-1</sup> + nut.	0,694 $\pm$ 0,023 ba	5 mg l <sup>-1</sup> + nut.	0,552 $\pm$ 0,014 de
11 mg l <sup>-1</sup> + nut.	0,610 $\pm$ 0,012 c	3 mg l <sup>-1</sup> + nut.	0,706 $\pm$ 0,136 ba	6 mg l <sup>-1</sup> + nut.	0,554 $\pm$ 0,034 de
12 mg l <sup>-1</sup> + nut.	0,629 $\pm$ 0,014 bc	4 mg l <sup>-1</sup> + nut.	0,737 $\pm$ 0,107 ba	7 mg l <sup>-1</sup> + nut.	0,520 $\pm$ 0,028 e
Control + nut.	0,850 $\pm$ 0,029 d	Control + nut.	0,801 $\pm$ 0,097 ba	Control + nut.	0,611 $\pm$ 0,020 d

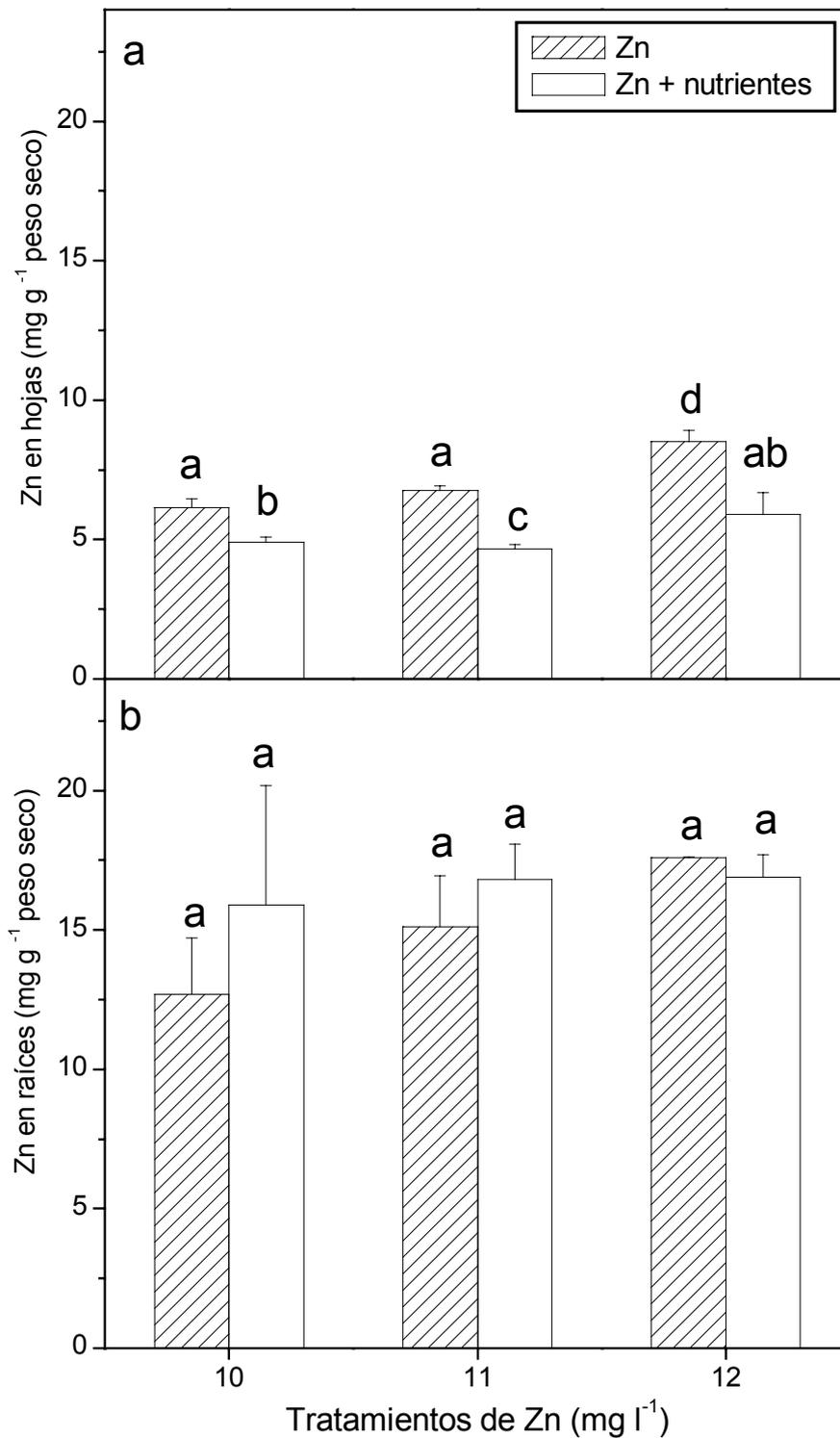


Fig. 2.8. Concentraciones de Zn en hojas (a) y raíces (b) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Zn definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.



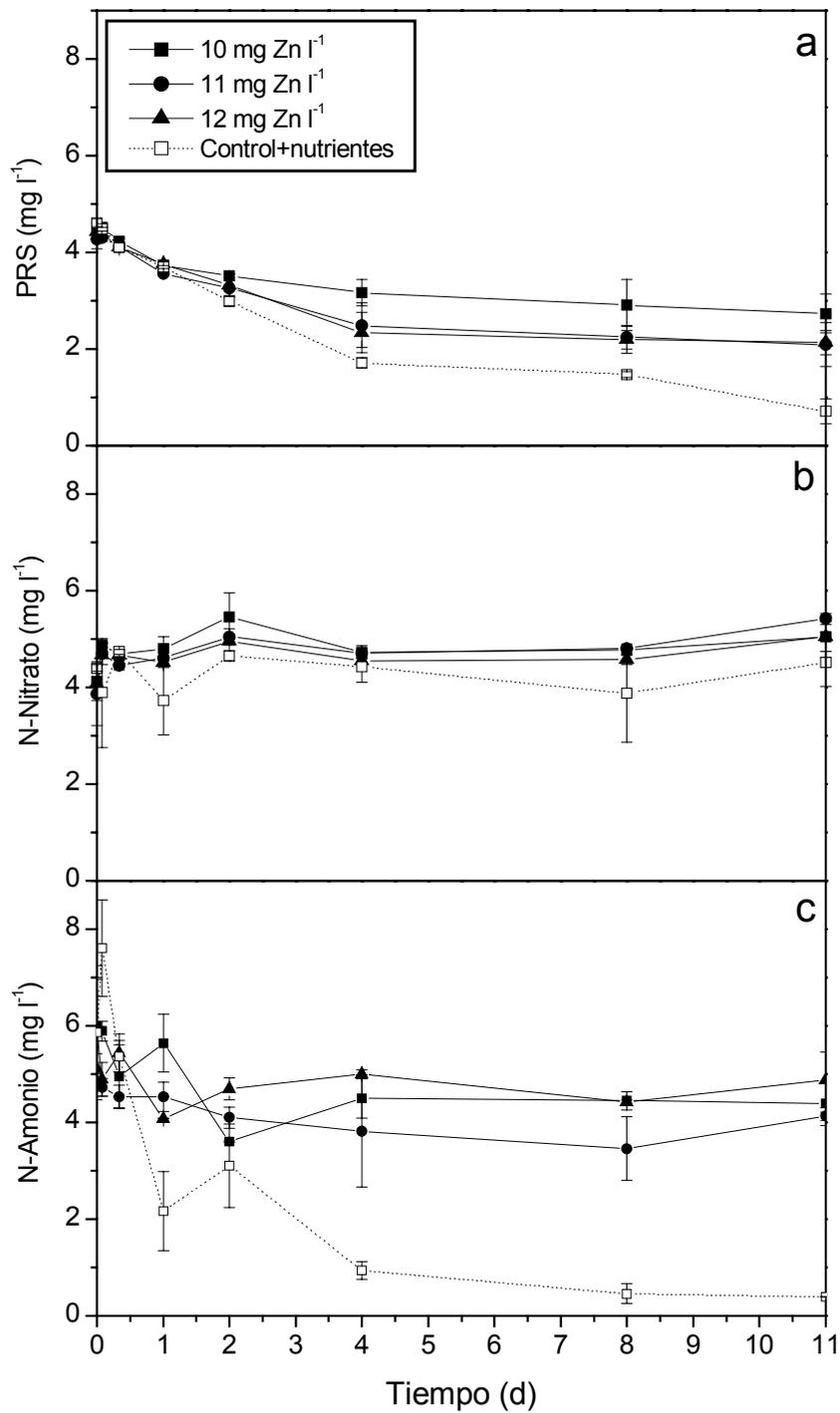


Fig. 2.10. Concentraciones de PRS (a), N-Nitrato (b) y N-Amonio (c) obtenidas durante el período de experimentación en cada tratamiento de Zn aplicado en acuarios con agregado de Zn + nutrientes.

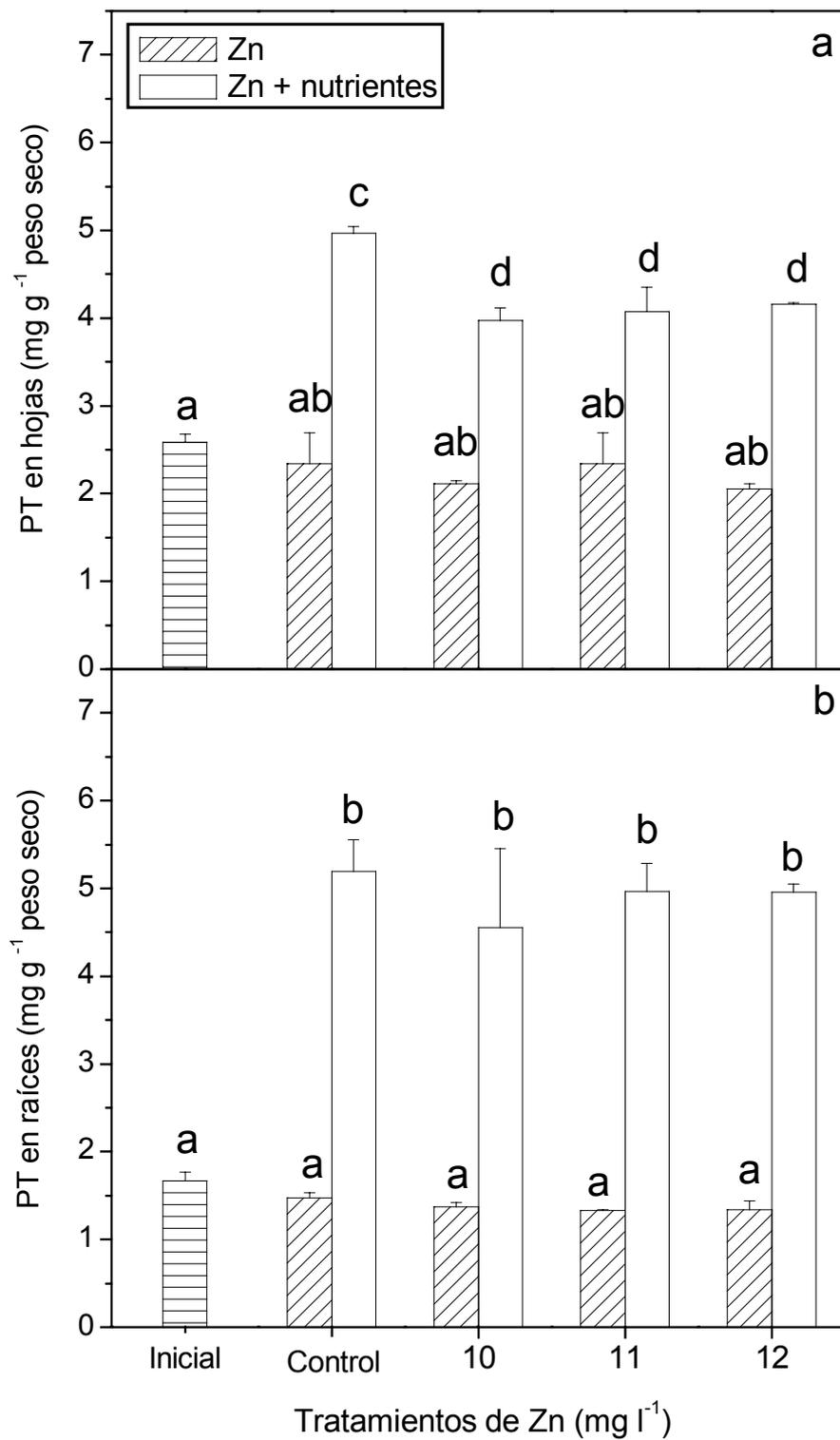


Fig. 2.11. Concentraciones de PT en hojas (a) y raíces (b) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Zn definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

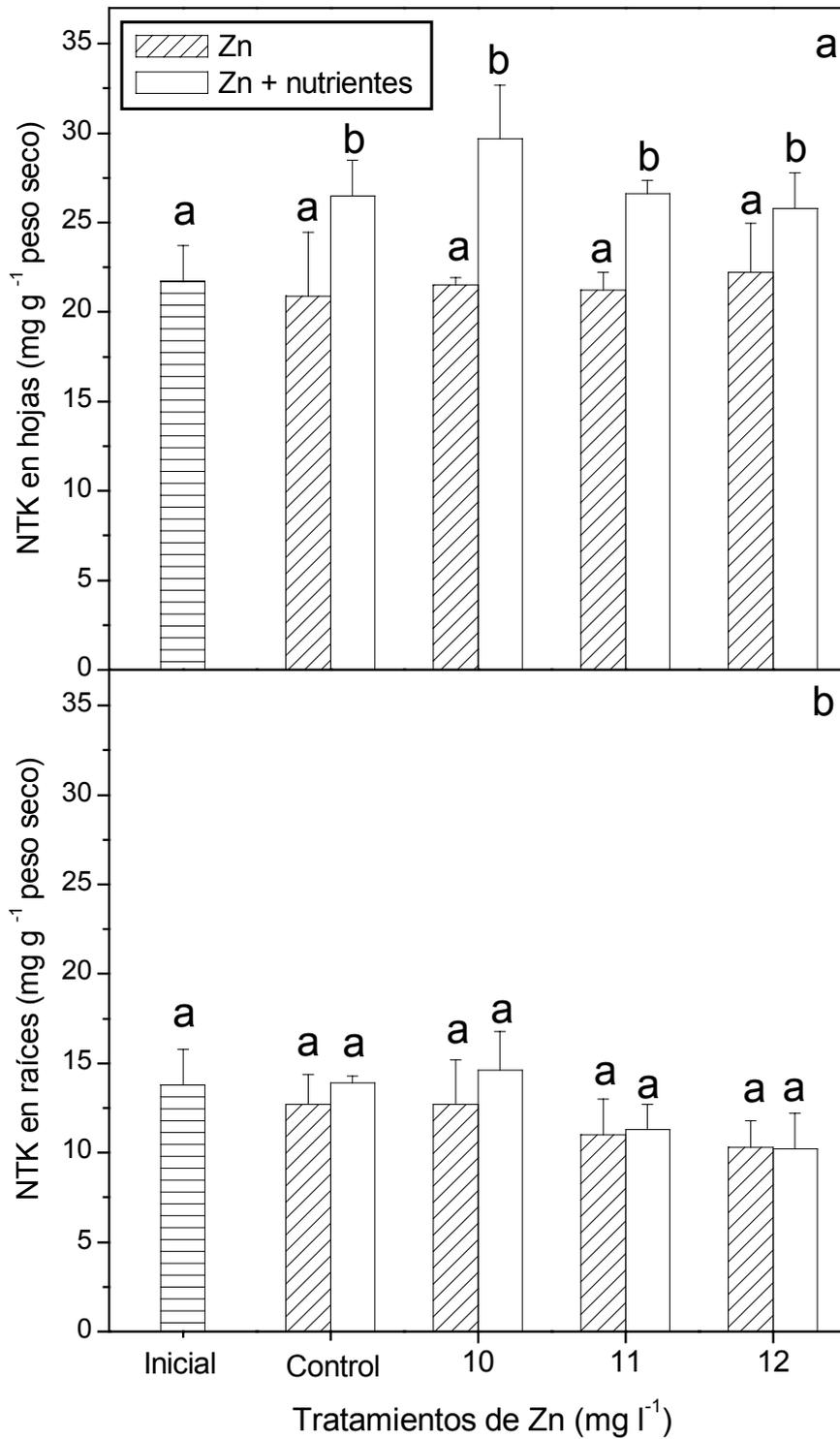


Fig. 2.12. Concentraciones de NTK en hojas (a) y raíces (b) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Zn definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

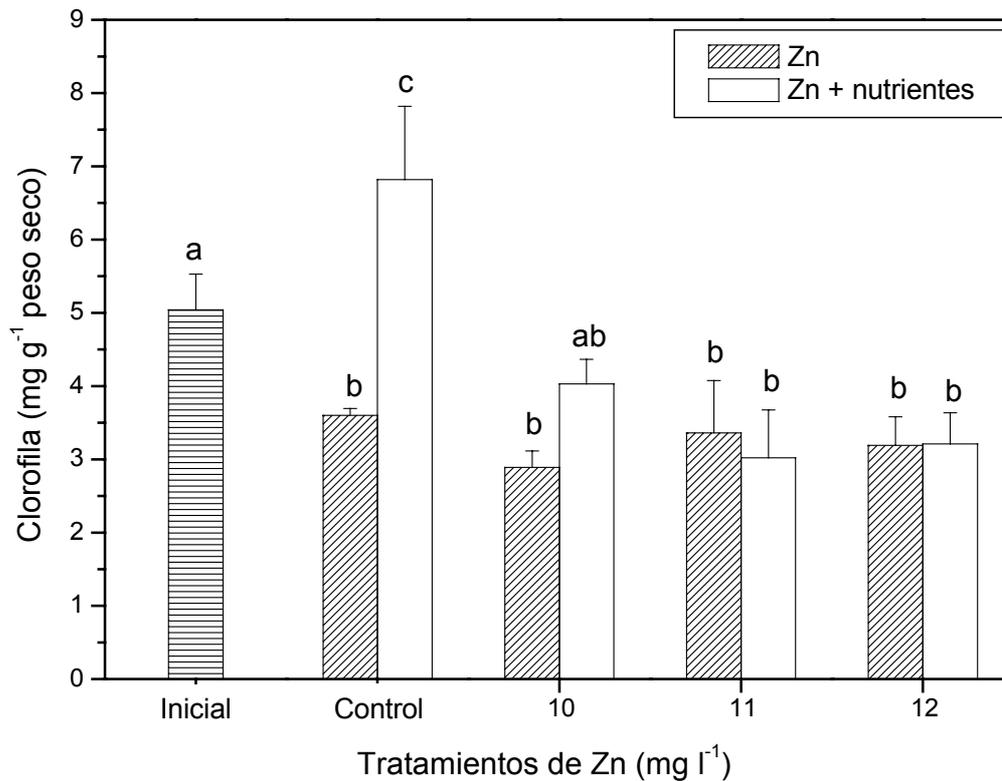


Fig. 2.13. Concentraciones de clorofila en *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Zn definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

#### 2.3.4. Efecto del enriquecimiento con nutrientes sobre la toxicidad al Ni:

Los tratamientos expuestos a todas las concentraciones ensayadas de Ni (mínima: 2 mg l<sup>-1</sup>) mostraron tasas de crecimiento relativo significativamente inferiores que los controles, mientras que los tratamientos enriquecidos con nutrientes no mostraron diferencias significativas con los controles (Fig. 2.14).

Las concentraciones de Ni en tejidos vegetales de los controles se encontraron por debajo de los límites de detección del método. Las concentraciones de Ni en los tratamientos expuestos a este metal fueron significativamente mayores en raíces que en hojas y en los tratamientos con mayor concentración de Ni (Fig. 2.15). El enriquecimiento con nutrientes no causó cambios significativos en las concentraciones de Ni en los tejidos vegetales. Las concentraciones de Ni en agua disminuyeron a lo largo del tiempo (Fig. 2.16), siendo las concentraciones finales mayores a medida que aumentaron las concentraciones iniciales. Las concentraciones de PRS y amonio en agua disminuyeron con el tiempo en los tratamientos

enriquecidos con nutrientes (Fig. 2.17). La exposición al Ni disminuyó la remoción de PRS y amonio. La concentración de nitrato no mostró variaciones significativas. La concentración de PT en hojas fue significativamente mayor que la de raíces en los tratamientos sin agregado de nutrientes (Fig. 2.18). El enriquecimiento con nutrientes incrementó la concentración de PT en tejidos vegetales. Las concentraciones de PT en hojas fueron significativamente inferiores en los tratamientos expuestos al Ni en comparación con el control enriquecido con nutrientes. El NTK fue significativamente mayor en hojas que en raíces (Fig. 2.19). Un aumento aparente en la concentración de NTK en hojas en los tratamientos con enriquecimiento con nutrientes no fue estadísticamente significativo. Los tratamientos expuestos al Ni mostraron concentraciones de clorofila significativamente inferiores que la de los controles, mientras que los tratamientos expuestos a las menores concentraciones de Ni y enriquecidos con nutrientes no mostraron diferencias significativas con el control sin agregado de nutrientes (Fig. 2.20).

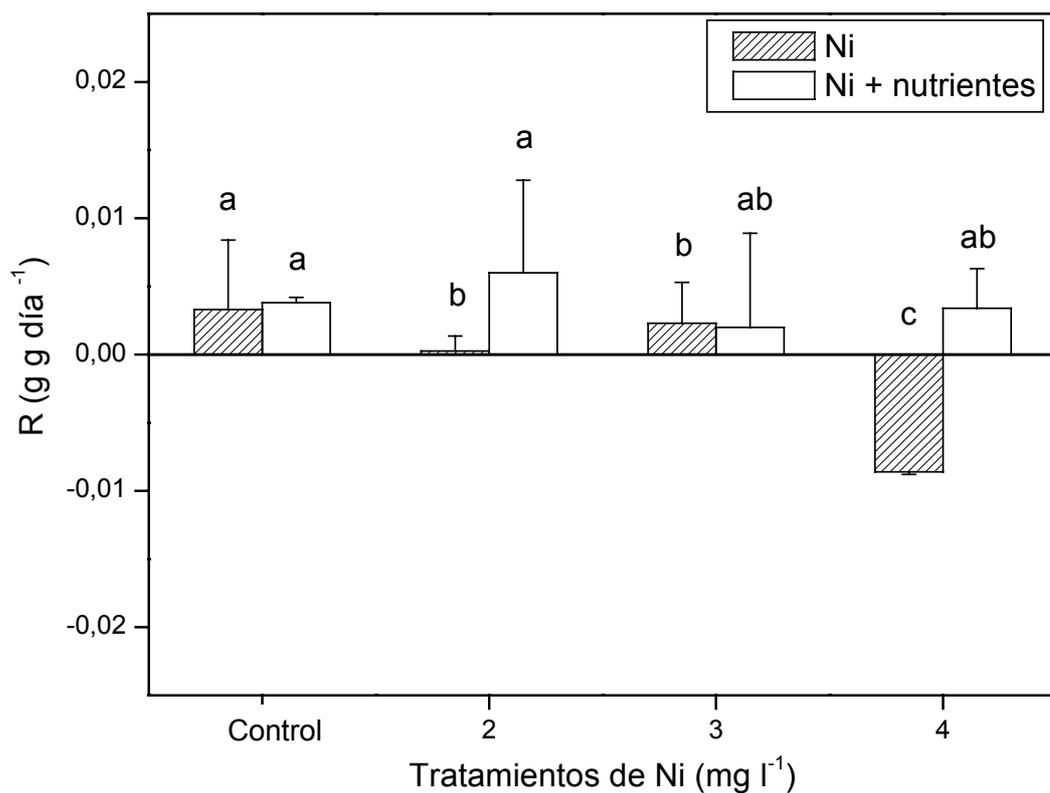


Fig. 2.14. Tasas de crecimiento relativo (R) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Ni definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

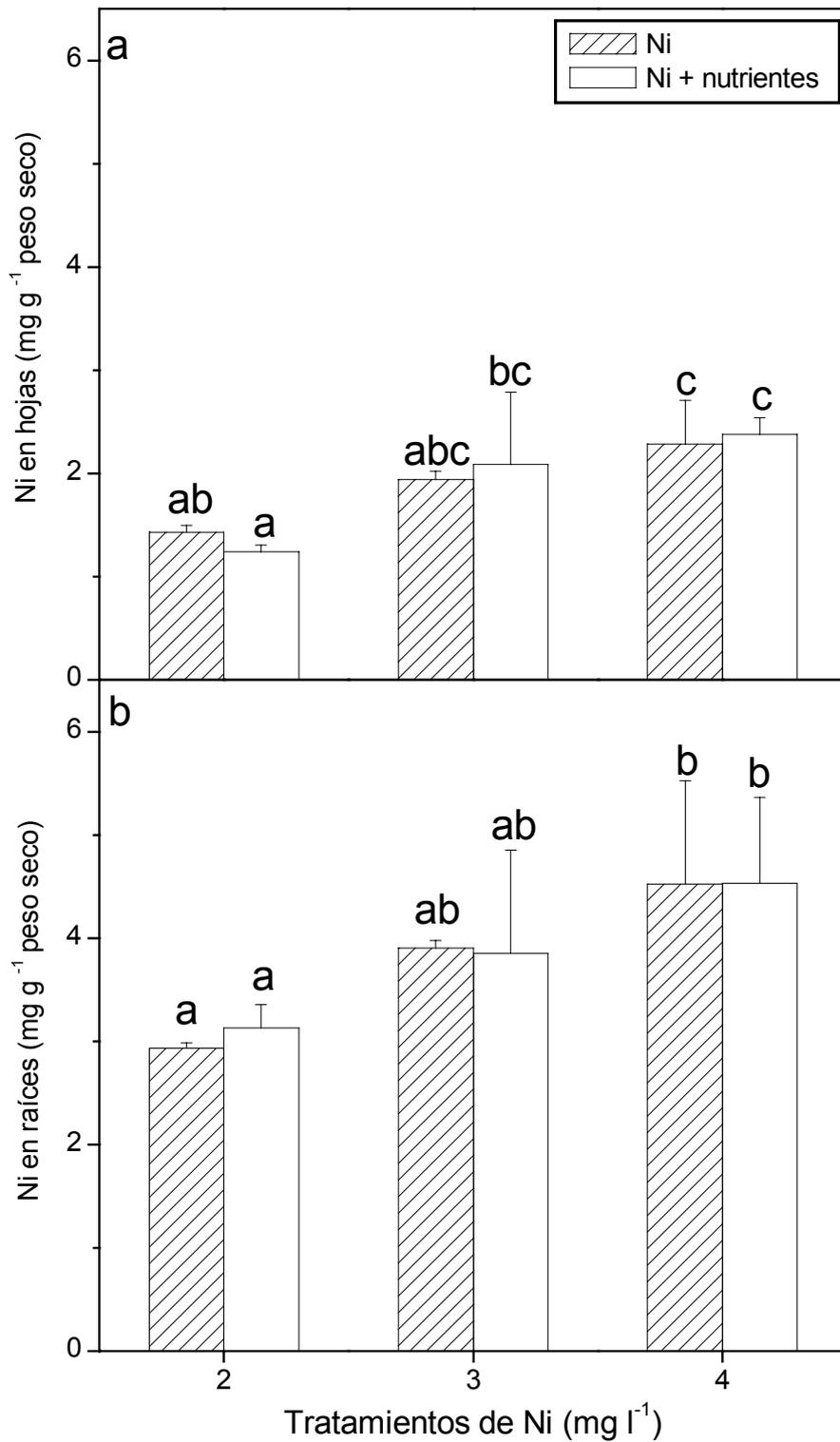


Fig. 2.15. Concentraciones de Ni en hojas (a) y raíces (b) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Ni definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

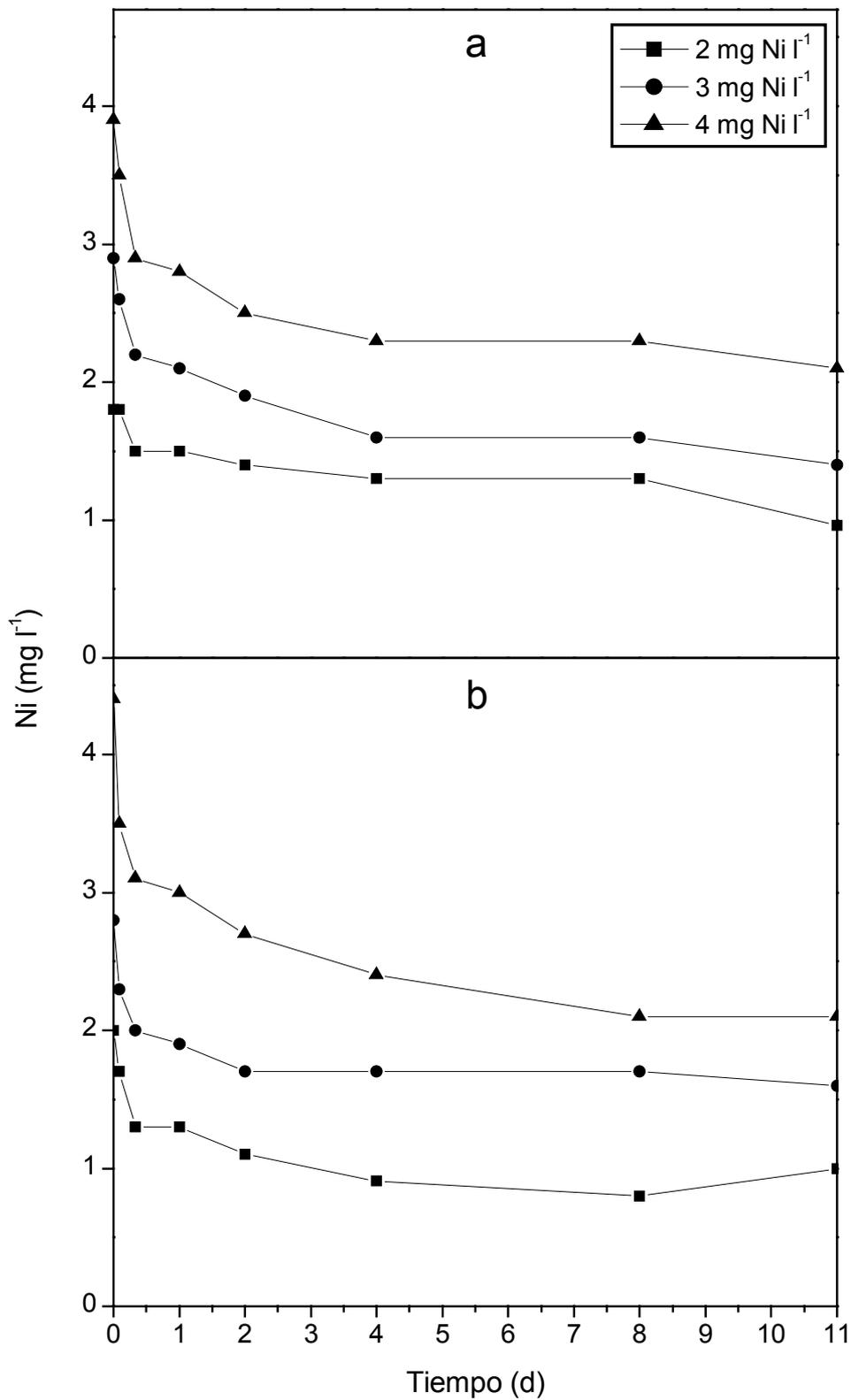


Fig. 2.16. Concentraciones de Ni en agua obtenidas durante el período de experimentación en cada tratamiento aplicado en acuarios con agregado de Ni (a) y en acuarios con agregado de Ni + nutrientes (b).

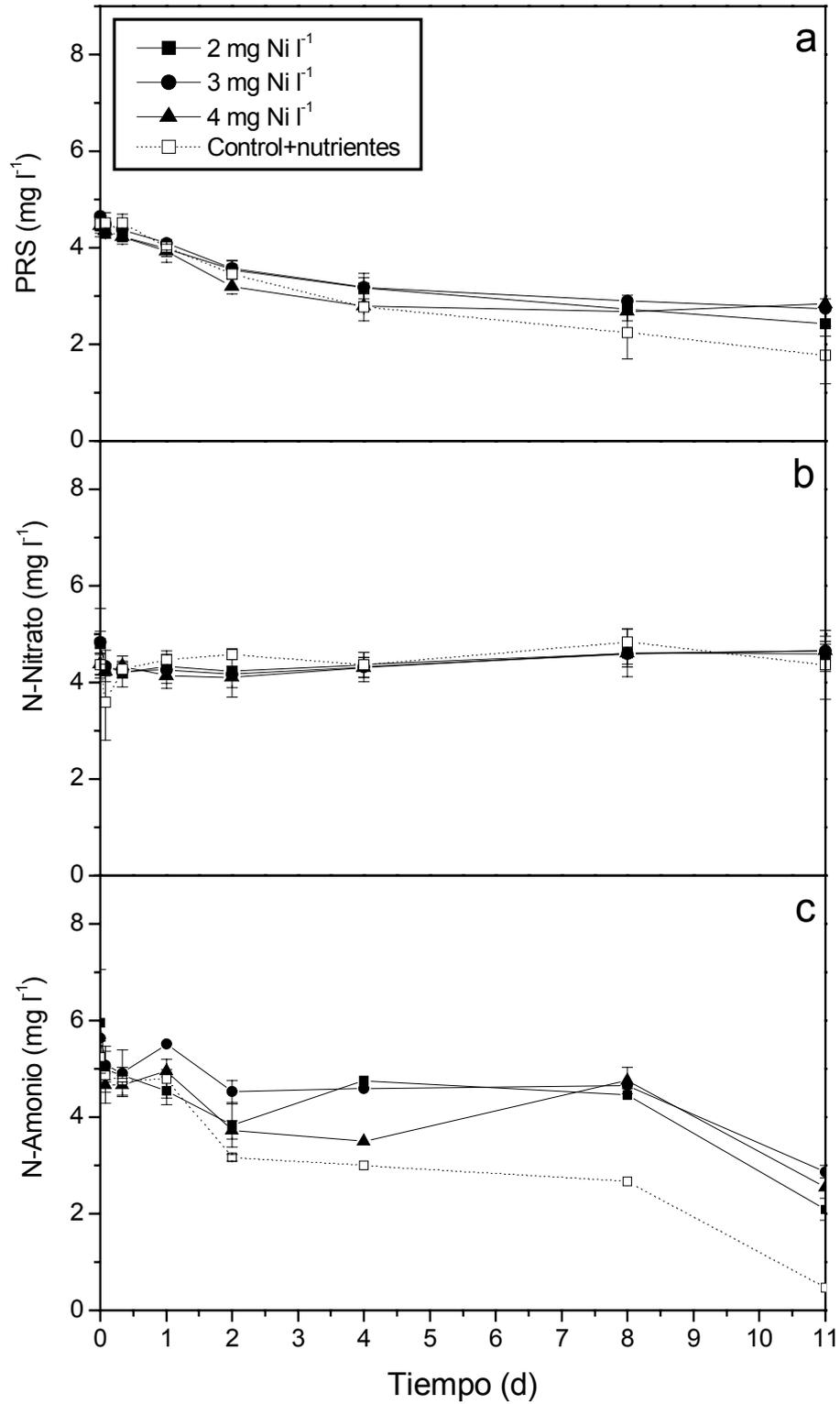


Fig. 2.17. Concentraciones de PRS (a), N-Nitrato (b) y N-Amonio (c) obtenidas durante el período de experimentación en cada tratamiento de Ni aplicado en acuarios con agregado de Ni + nutrientes.

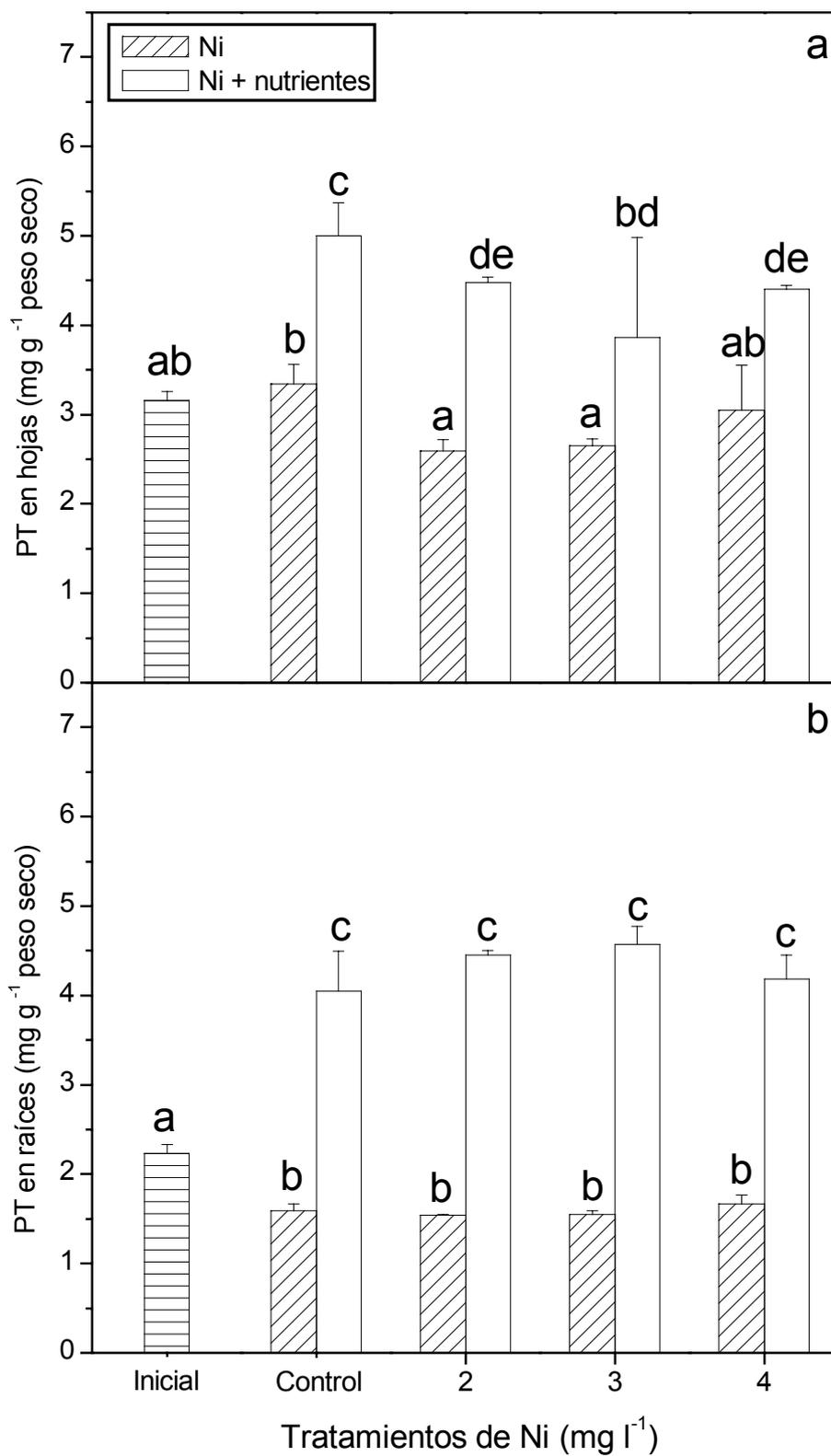


Fig. 2.18. Concentraciones de PT en hojas (a) y raíces (b) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Ni definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

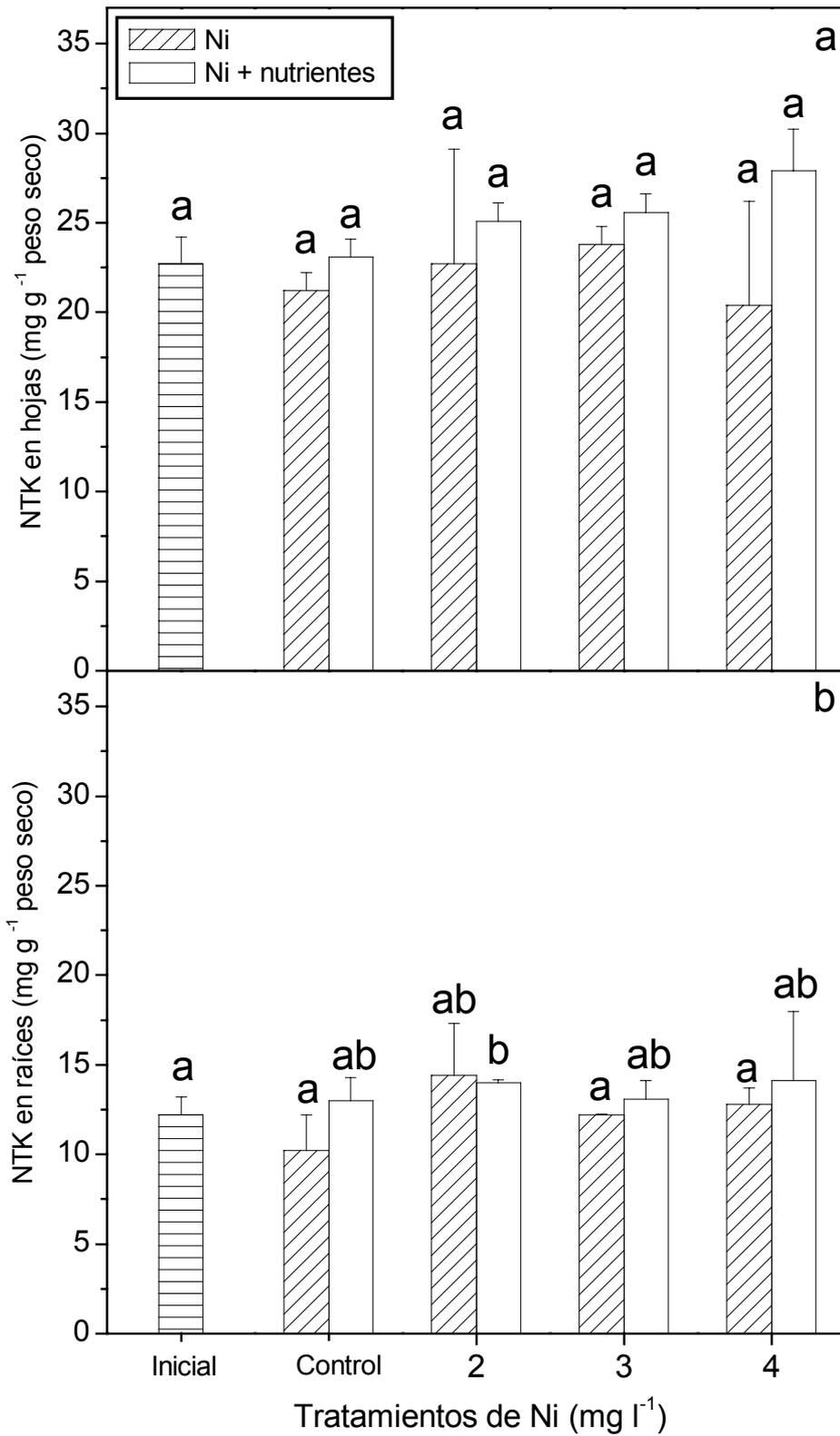


Fig. 2.19. Concentraciones de NTK en hojas (a) y raíces (b) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Ni definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

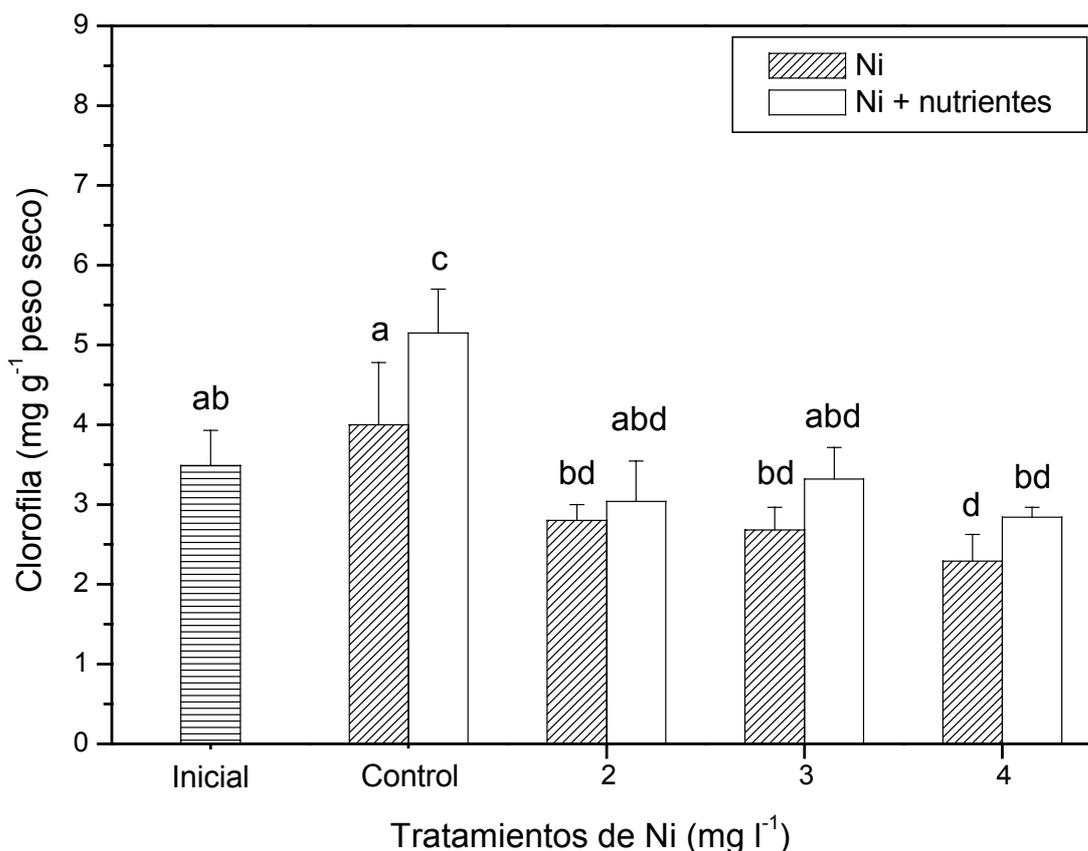


Fig. 2.20. Concentraciones de clorofila en *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Ni definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

### 2.3.5. Efecto del enriquecimiento con nutrientes sobre la toxicidad al Cr:

La exposición al Cr redujo la biomasa de raíces en todos los tratamientos expuestos a las diferentes concentraciones de metal ensayadas, mientras que la exposición al Cr enriquecida con nutrientes mostró una significativamente mayor biomasa de raíces (Tabla 2.2). Se observó una reducción significativa del crecimiento en el tratamiento expuesto a 7 mg Cr l<sup>-1</sup> (Fig. 2.21). No se encontraron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento relativo de los tratamientos expuestos a 5 y 6 mg Cr l<sup>-1</sup> y el control. Se observó una atenuación de la reducción de biomasa en la exposición a 7 mg Cr l<sup>-1</sup> en el tratamiento enriquecido con nutrientes. Las concentraciones de Cr en tejidos vegetales de los controles se encontraron por debajo de los límites de detección del método. Las concentraciones de Cr fueron significativamente mayores en raíces que en hojas (Fig. 2.22). La concentración de Cr en raíces aumentó conforme aumentó la concentración en el agua. El enriquecimiento con nutrientes no causó ningún cambio significativo en las concentraciones de Cr en hojas y raíces. Se observó una rápida disminución de la concentración de Cr en agua sin registrar

diferencias entre los tratamientos (Fig. 2.23), removiéndose de la solución aproximadamente el 90% del Cr agregado después del primer día de comenzado el experimento. La concentración de nutrientes en agua disminuyó a lo largo del tiempo en los tratamientos enriquecidos con nutrientes (Fig. 2.24). Las concentraciones de PT fueron significativamente mayores en hojas que en raíces en los tratamientos sin agregado de nutrientes (Fig. 2.25). El enriquecimiento con P produjo concentraciones significativamente mayores de PT en hojas y raíces. Los tratamientos expuestos al Cr + nutrientes mostraron concentraciones de PT significativamente mayores en las raíces que el control enriquecido con nutrientes. Las concentraciones de NTK fueron significativamente mayores en hojas que en raíces (Fig. 2.26). El enriquecimiento con nutrientes incrementó la concentración de NTK en hojas pero no en raíces. Las concentraciones de clorofila no fueron estadísticamente diferentes entre los tratamientos (Fig. 2.27).

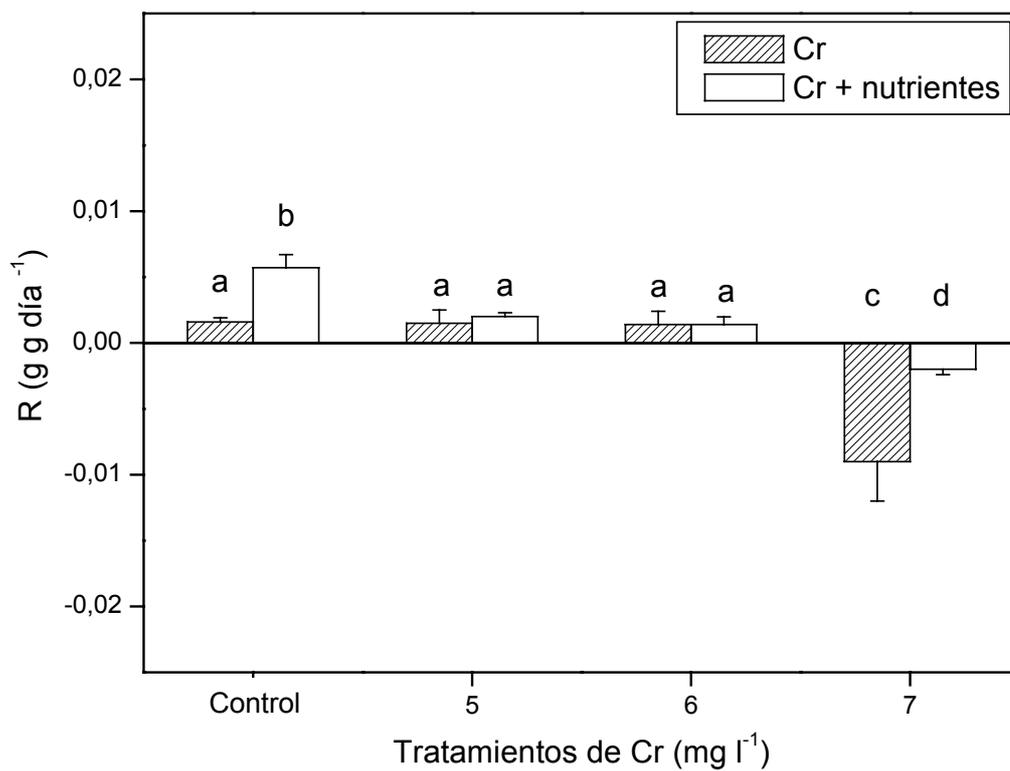


Fig. 2.21. Tasas de crecimiento relativo (R) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Cr definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

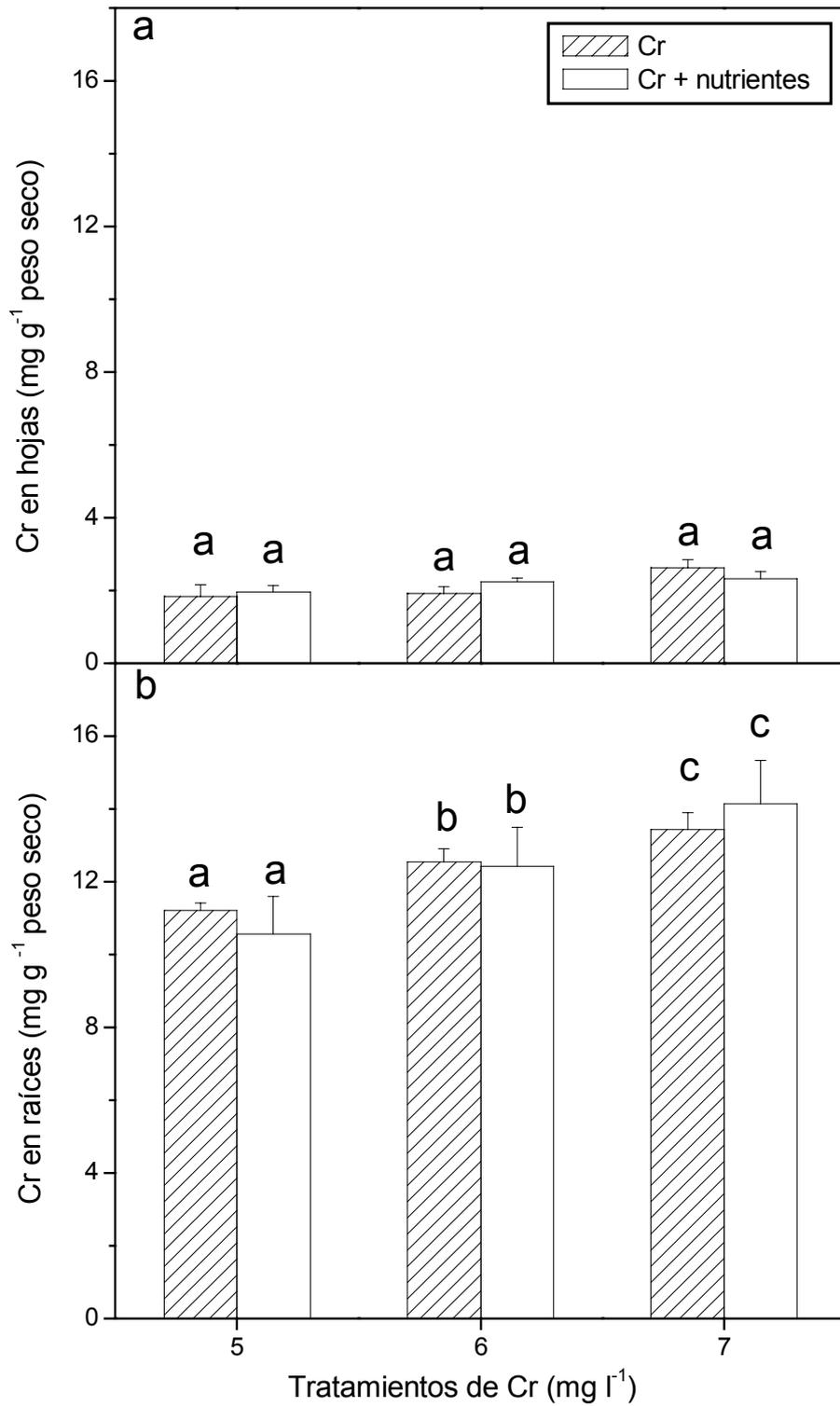


Fig. 2.22. Concentraciones de Cr en hojas (a) y raíces (b) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Cr definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

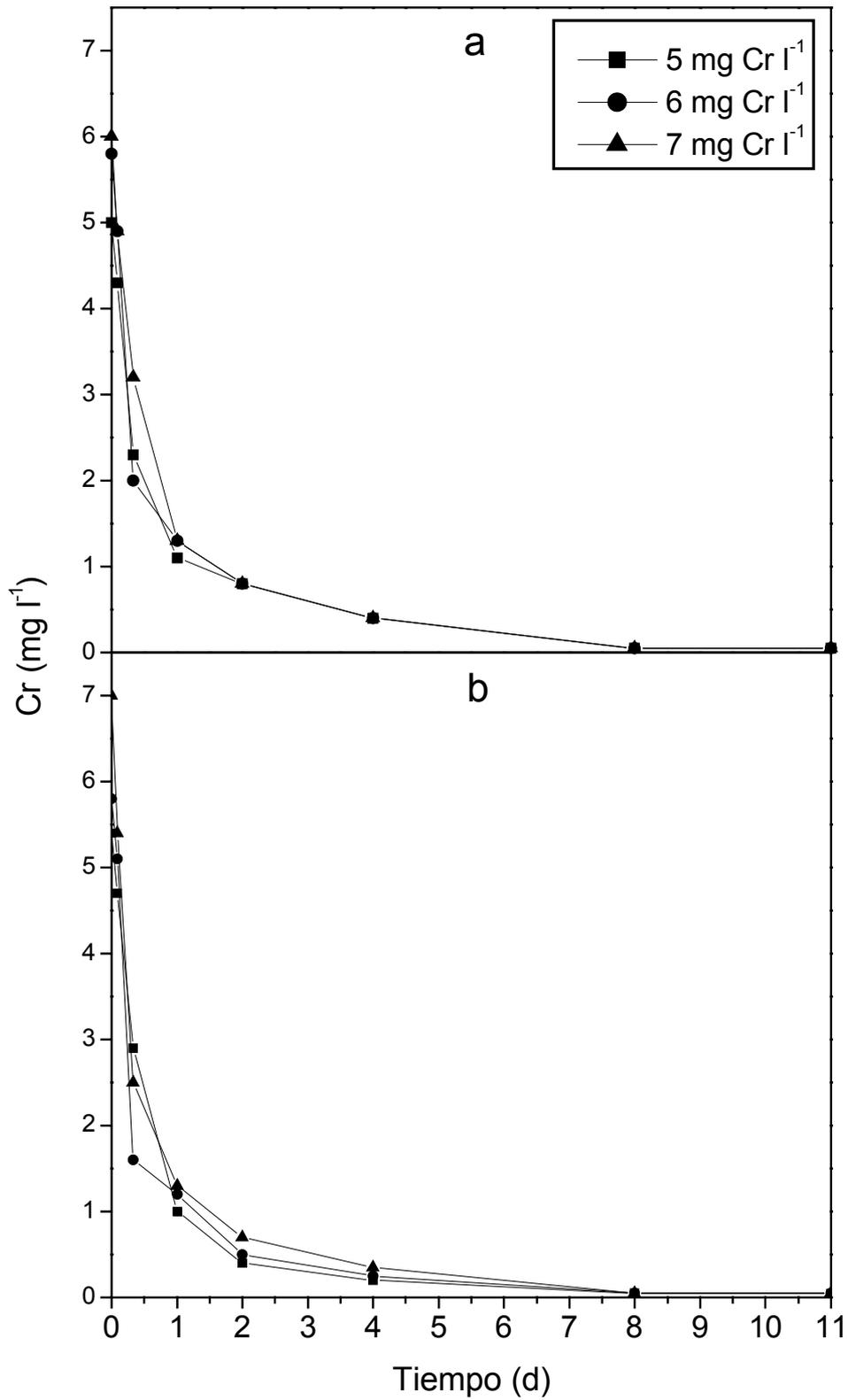


Fig. 2.23. Concentraciones de Cr en agua obtenidas durante el período de experimentación en cada tratamiento aplicado en acuarios con agregado de Cr (a) y en acuarios con agregado de Cr + nutrientes (b).

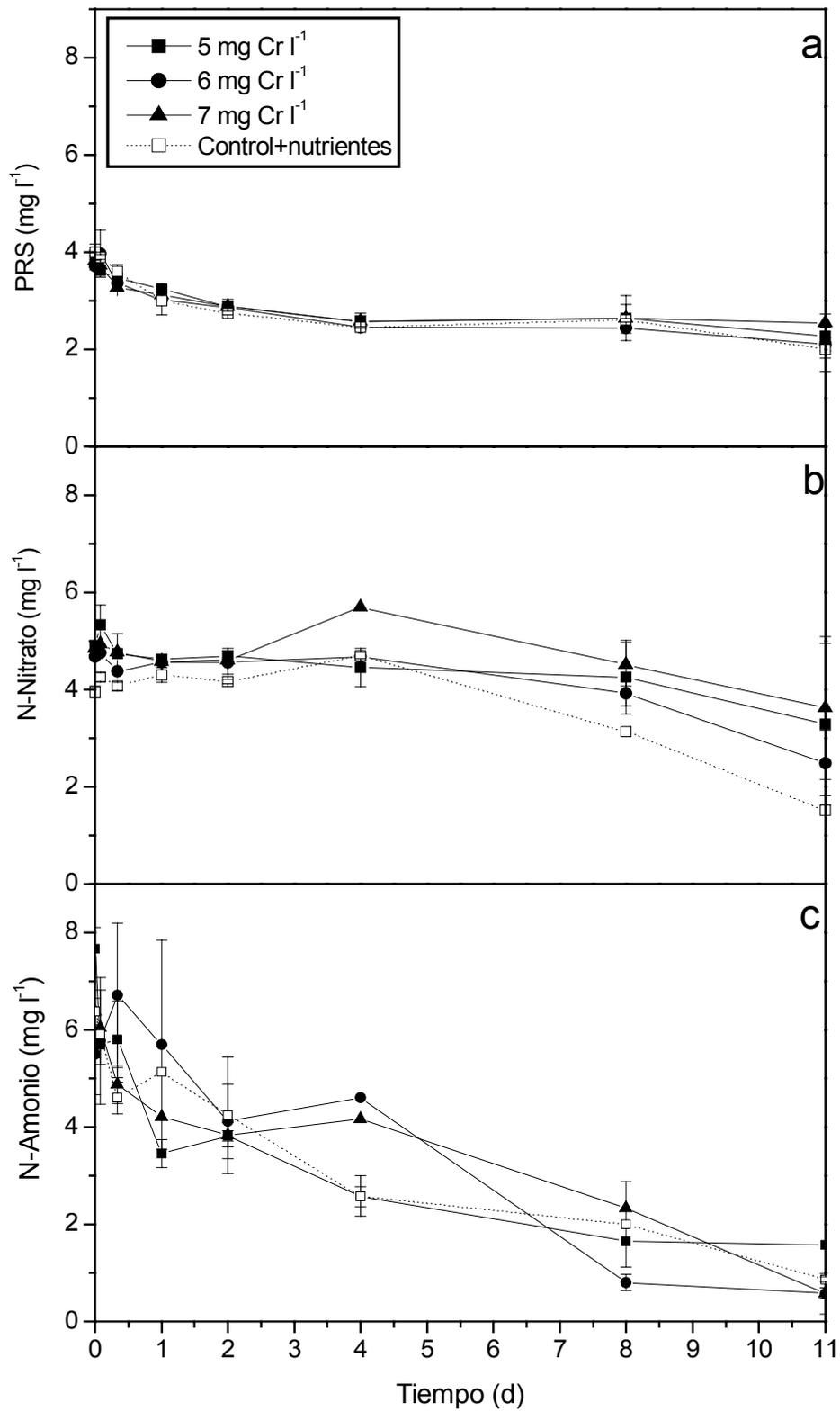


Fig. 2.24. Concentraciones de PRS (a), N-Nitrato (b) y N-Amonio (c) obtenidas durante el período de experimentación en cada tratamiento de Cr aplicado en acuarios con agregado de Cr + nutrientes.

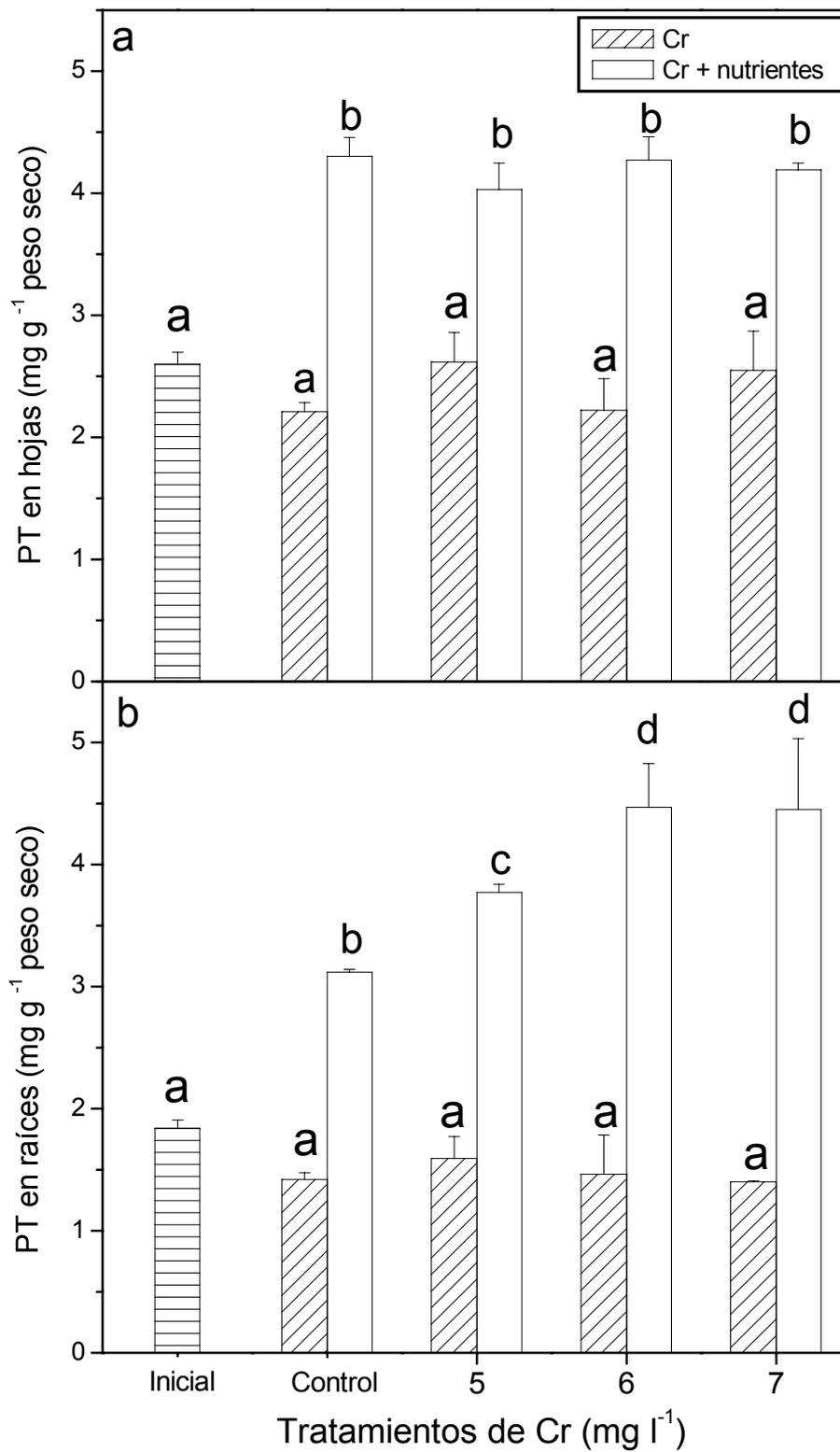


Fig. 2.25. Concentraciones de PT en hojas (a) y raíces (b) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Cr definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

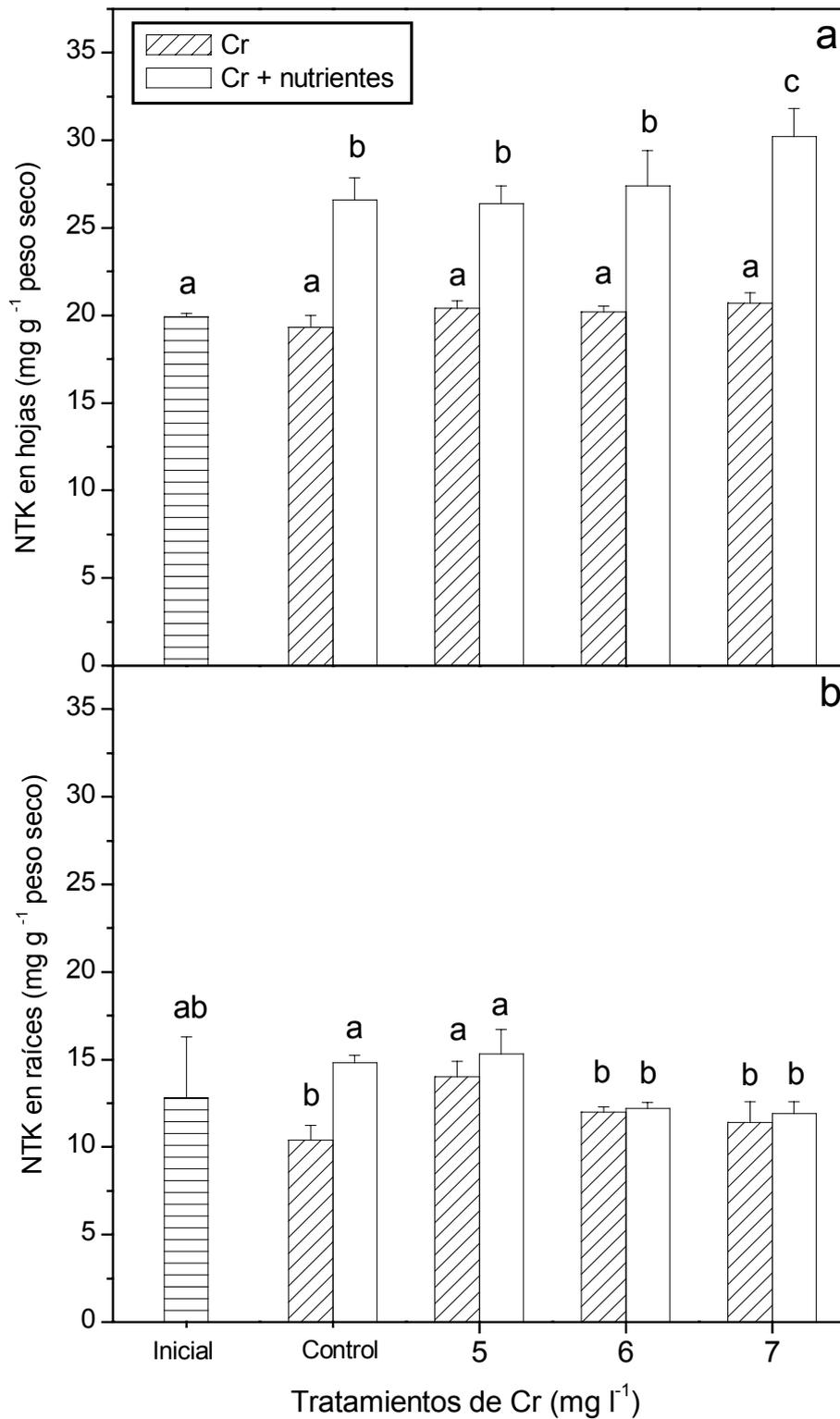


Fig. 2.26. Concentraciones de NTK en hojas (a) y raíces (b) de *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Cr definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

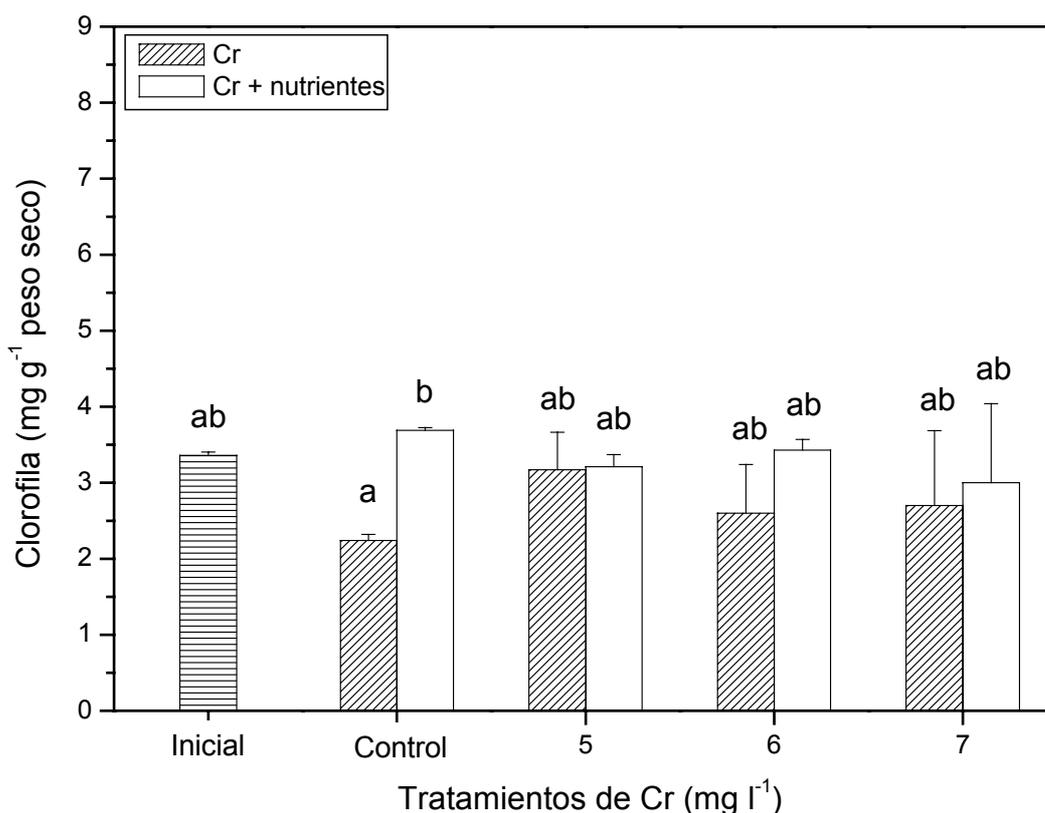


Fig. 2.27. Concentraciones de clorofila en *S. herzogii* obtenidas en los distintos tratamientos aplicados en la experiencia de Cr definitiva. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas. Las barras representan los desvíos estándar.

### 2.3.6. Balance de metales de los experimentos de toxicidad al Cr, Ni y Zn:

Las concentraciones de metales en tejidos vegetales fueron significativamente diferentes para los tres metales estudiados. Para las raíces, dichas concentraciones siguieron el mismo orden en que los metales fueron agregados: Zn>Cr>Ni, mientras que para las hojas, la relación fue: Zn>>Cr≈Ni. Las concentraciones iniciales de metales en agua se correlacionaron significativamente con las concentraciones finales de metales en raíces ( $r= 0,938$ ,  $p= 0,0002$ ) y hojas ( $r= 0,943$ ,  $p= 0,0001$ ) en los tratamientos enriquecidos con nutrientes, al igual que las concentraciones de metales en raíces ( $r= 0,906$ ,  $p= 0,0008$ ) y hojas ( $r= 0,937$ ,  $p= 0,0002$ ) en los tratamientos con agregado de metal.

La Tabla 2.3 muestra el balance de metales para cada tratamiento. La cantidad removida se estimó como la diferencia entre las concentraciones iniciales y finales en agua. La diferencia entre la cantidad removida de la solución y el contenido de metal en el tejido vegetal se consideró asociada a la fracción detrítica. La remoción de Zn aumentó desde 35-

42% en los tratamientos sin adición de nutrientes hasta 50-57% en los tratamientos enriquecidos con nutrientes. El aumento de la remoción se debió a un aumento de la fracción detrítica en los tratamientos enriquecidos con nutrientes. La remoción de Ni representó aproximadamente la mitad de la concentración inicial agregada, encontrándose la mayor parte de este metal en la biomasa vegetal, sin registrar diferencias significativas entre los tratamientos. El Cr fue casi completamente removido de la solución. La cantidad de Cr retenida en el detrito fue mayor que la retenida en la biomasa de *S. herzogii*. El enriquecimiento con nutrientes incrementó el Cr retenido en la biomasa vegetal.

Tabla 2.3. Balance de metales (mg) obtenidos en los experimentos del efecto del enriquecimiento con nutrientes sobre la tolerancia al Zn, Ni y Cr.

	Tratamientos	% de remoción	Metal en biomasa	Metal en detrito
Zn	10 mg l <sup>-1</sup>	35	15,7	1,8
	11 mg l <sup>-1</sup>	41	20,0	2,6
	12 mg l <sup>-1</sup>	42	24,3	0,7
	10 mg l <sup>-1</sup> + nut.	57	21,5	7,0
	11 mg l <sup>-1</sup> + nut.	50	18,8	7,2
	12 mg l <sup>-1</sup> + nut.	53	25,2	6,8
Ni	2 mg l <sup>-1</sup>	47	5,4	0,1
	3 mg l <sup>-1</sup>	52	7,1	0,4
	4 mg l <sup>-1</sup>	46	8,7	0,3
	2 mg l <sup>-1</sup> + nut.	50	4,7	0,4
	3 mg l <sup>-1</sup> + nut.	43	5,5	0,5
	4 mg l <sup>-1</sup> + nut.	52	8,3	3,2
Cr	5 mg l <sup>-1</sup>	99	10,7	14
	6 mg l <sup>-1</sup>	99	10,8	18
	7 mg l <sup>-1</sup>	99	16,1	16
	5 mg l <sup>-1</sup> + nut.	99	11,9	15
	6 mg l <sup>-1</sup> + nut.	99	15,0	14
	7 mg l <sup>-1</sup> + nut.	99	18,0	17

## 2.4. Discusión:

### 2.4.1. Experimentos de pH y conductividad:

La salinidad en el afluente del humedal construido a escala reducida fue mayor al umbral de tolerancia determinado experimentalmente para *E. crassipes* en 14 de 16 muestreos y el pH en aproximadamente la mitad de los mismos. Los resultados obtenidos sugieren que la desaparición de *E. crassipes* del humedal a escala reducida se debió fundamentalmente a la elevada salinidad y pH del afluente. *P. stratiotes* y *S. herzogii* presentaron rangos de

tolerancia más elevados que *E. crassipes* y consistentemente, su persistencia en el humedal fue mayor. El pH del afluyente fue 12,5 en octubre de 2001 y 11,9 en febrero de 2002, correspondiendo con los muestreos previos a la desaparición de *S. herzogii* y *P. stratiotes*, respectivamente. Cabe mencionar que *S. herzogii* se transplantó en el humedal construido a escala reducida a una menor densidad en comparación con las otras especies debido a una escasa disponibilidad en el humedal natural durante la recolección de macrófitas para ser transplantadas en el humedal construido.

Siendo las concentraciones de metales registradas en el afluyente del humedal experimental y en tejidos vegetales muy inferiores a los umbrales de tolerancia determinados experimentalmente en el presente Capítulo, como así también a los registros citados en la bibliografía, puede concluirse que la desaparición de las especies flotantes se debió a la elevada salinidad y pH del afluyente.

#### 2.4.2. Efecto del enriquecimiento con nutrientes sobre la tolerancia a los metales:

En el experimento de exposición de *S. herzogii* al Zn, el enriquecimiento con nutrientes permitió el mismo crecimiento en los tratamientos con exposición que los controles mientras que los tratamientos en que no se agregaron nutrientes mostraron tasas de crecimiento inferiores. Las concentraciones de Zn en hojas fueron menores en los tratamientos enriquecidos con nutrientes (Fig. 2.8), mientras que las concentraciones de P en hojas fueron inferiores en los tratamientos con agregado de Zn (Fig. 2.11). Chaney (1993) observó que plantas que sufren toxicidad por Zn contienen menores concentraciones de P en los tejidos, sugiriendo que la toxicidad podría resultar en una inhibición del crecimiento radicular o en la formación de fosfato de Zn insoluble, inmobilizado en las raíces. Loneragan y Weeb (1993) informaron que el P deprime la absorción de Zn en las raíces y la translocación de Zn desde las raíces hacia las partes aéreas, concluyendo que bajo condiciones de una alta disponibilidad de Zn, ocurre una inmobilización en las raíces a través de la formación de fitato de Zn. Debido a que en los experimentos llevados a cabo la biomasa de raíces no disminuyó significativamente en los tratamientos enriquecidos con nutrientes y la concentración de Zn en raíces no disminuyó, la inmobilización simultánea de P y Zn en las raíces parecería ser el mecanismo que explica el aumento de la tolerancia de *S. herzogii* a la exposición de Zn. La disminución de la concentración de clorofila en los tratamientos expuestos a Zn enriquecidos con nutrientes es coincidente con la observación de que un exceso de Zn interfiere con la síntesis de clorofila (Chaney, 1993). Sin embargo, el

crecimiento disminuyó a concentraciones de Zn en las cuales la clorofila no se vio disminuida (Figs. 2.7 y 2.13), sugiriendo que otra vía metabólica fue afectada, y que la tasa de crecimiento es un indicador más temprano y sensible de la toxicidad al Zn en comparación con la concentración de clorofila.

La exposición al Ni disminuyó simultáneamente la tasa de crecimiento y la concentración de clorofila sugiriendo que la toxicidad a este metal estuvo mediada por un mecanismo de degradación de clorofila, constituyéndose ambos parámetros como adecuados indicadores de toxicidad de Ni. Monni et al. (2000) observaron inhibición del crecimiento en *Empetrum nigrum* L., un arbusto ericáceo, con un aumento de las concentraciones de Ni y Cu en solución. Las respuestas más claras a la exposición de metales se expresaron en los pesos secos de raíces y partes aéreas. Los autores sugirieron que la supresión del crecimiento es el costo de la tolerancia debido a que, aunque el crecimiento fue afectado, la supervivencia no disminuyó durante los experimentos.

La inhibición del crecimiento de raíces por la exposición al Cr observada en el presente estudio ha sido previamente registrada y representa un indicador sensible de la toxicidad del Cr (Shanker et al., 2005; Scoccianti et al., 2006). La reducción de la biomasa de raíces en las exposiciones al Cr fueron revertidas por el enriquecimiento con nutrientes, sugiriendo así un efecto positivo del enriquecimiento sobre la tolerancia de *S. herzogii* al Cr. Las exposiciones más bajas aplicadas no mostraron cambios significativos sobre las tasas de crecimiento relativo, mientras que las concentraciones más altas mostraron una tasa de crecimiento relativo negativa que fue atenuada con el enriquecimiento de nutrientes. Debido a que no se observaron efectos sobre las concentraciones de clorofila, la toxicidad del Cr parecería no estar mediada por el metabolismo fotosintético en las condiciones experimentales aplicadas. Maine et al. (2004) observaron que la concentración de clorofila de *P. stratiotes* disminuyó a concentraciones de Cr en agua mayores a  $1 \text{ mg l}^{-1}$ , mientras que *S. herzogii* no mostró cambios significativos en las concentraciones de clorofila hasta concentraciones de Cr de  $6 \text{ mg l}^{-1}$ .

Göthberg et al. (2004) observaron altas concentraciones de metales en *Ipomoea aquatica* Forsk. cultivada para consumo humano en cuerpos de agua cercanos a Bangkok que recibían cantidades variables de nutrientes. Los autores plantearon la hipótesis de que la fertilización podría atenuar la acumulación de metales. Consistentemente con las observaciones realizadas en los experimentos de invernadero en el presente trabajo, los experimentos de Göthberg et al. (2004) mostraron que el enriquecimiento con nutrientes incrementó la tolerancia de *I. aquatica* al Cd, Pb y Hg. Se registraron diferentes patrones de

concentración de metales en las hojas de *I. aquatica* debidos a la adición de nutrientes. Las concentraciones de Hg y Pb disminuyeron cuando los nutrientes aumentaron, similarmente a lo observado con el Zn en el presente estudio, mientras que las concentraciones de Cd no cambiaron con el enriquecimiento de nutrientes, similarmente a lo observado con el Ni y Cr en el presente estudio. Los autores sugirieron que la competencia de los metales con nutrientes y la inhibición de la traslocación hacia las partes aéreas sería un mecanismo plausible. El suministro de K reduce la acumulación de metales en tejidos vegetales (Göthberg et al., 2004). Debe hacerse notar que en el presente trabajo, el fosfato y el nitrato fueron agregados como sales de K. Mayores concentraciones de metales en raíces que en hojas de macrófitas expuestas a metales han sido observadas en el presente estudio en coincidencia con muchos otros trabajos (Sen y Bhattacharyya, 1994; Banerjee y Sarker, 1997; Göthberg et al., 2004; Paris et al., 2005). Por lo tanto, una mayor tolerancia de raíces en comparación con las partes aéreas, en conjunto con una tendencia a disminuir la translocación frente a un aumento de la concentración de metales en las raíces, representa una característica común para diferentes metales y especies de macrófitas. La unión de los iones metálicos tóxicos a cargas negativas en las paredes celulares de las raíces o la quelación a fitoquelatinas seguida por la acumulación en vacuolas, han sido propuestos como mecanismos para reducir el transporte de metales e incrementar la tolerancia a los mismos (Göthberg et al., 2004).

La concentración de metales en agua disminuyó con el tiempo en todos los experimentos. La disminución fue más rápida para el Cr, como fue observado previamente por Maine et al. (2004). El Cr(III) es rápidamente adsorbido a partículas y coloides (Masscheleyn et al., 1992). El balance de Cr (Tabla 2.3) sugiere que la remoción de la solución, más rápida que la del Zn y Ni, está más relacionada con la quelación fisicoquímica y adsorción a la fracción detrítica, que a la absorción por las plantas. El Cr fue principalmente adsorbido por la materia suspendida o por los restos orgánicos formados en el fondo derivados principalmente de fragmentos de raíces en descomposición. La presencia de materia suspendida en el agua permitió la adsorción del Cr, seguida por precipitación. La materia suspendida del agua del río se encuentra entre 60 y 110 mg l<sup>-1</sup> en el río Paraná (Drago y Amsler, 1988). La remoción de Cr en los experimentos fue casi completa en las diferentes concentraciones expuestas, igualmente a los resultados obtenidos en experimentos de laboratorio (Delgado et al., 1993, Maine et al., 2004), pero mayor que las eficiencias de remoción estimadas en los humedales construidos a escala reducida y definitivo en la empresa Bahco Argentina S. A. (82% y 65%, respectivamente, Tabla 1.2, Capítulo 1, y Tabla 3.3, Capítulo 3). El enriquecimiento con nutrientes incrementó la retención de Cr en la biomasa de

*S. herzogii* en los experimentos de invernadero (Tabla 2.3) sugiriendo que podría también incrementarse la remoción de Cr en los humedales construidos por un incremento en la absorción de las plantas. Las eficiencias de remoción de Zn y Ni en los experimentos de invernadero fueron similares a las eficiencias de remoción estimadas en los humedales construidos a escala piloto y definitivo. En los experimentos de invernadero, la remoción de Zn y Ni se debió principalmente a la absorción por *S. herzogii*. El enriquecimiento con nutrientes incrementó la eficiencia de remoción en las exposiciones al Zn debido al incremento de la retención de metales en la fracción detrítica.

El PRS y el amonio fueron removidos en los tratamientos enriquecidos con nutrientes. La preferencia de amonio sobre nitrato por *S. herzogii* es consistente con observaciones previas de Panigatti y Maine (2003). El amonio es una fuente de nitrógeno que es rápidamente transportada por sistemas localizados en los plasmalemas de las macrófitas, mientras que el nitrato requiere energía para ser reducido para incorporarse posteriormente en la síntesis de proteínas (Bishop y Eighmy, 1989). La exposición al Zn y Ni redujo la remoción de nutrientes de la solución (Figs. 2.10 y 2.17) y la concentración de P en las hojas, enfatizando la competencia entre los metales y los nutrientes por los sitios de absorción activos de las raíces y en el sistema de translocación, como fue sugerido por Göthberg et al (2004). Debido a que la remoción de Cr estuvo principalmente mediada por la fracción detrítica, la exposición al Cr no produjo una disminución de la remoción de nutrientes de la solución (Fig. 2.24), ni tampoco algún cambio discernible en la concentración de PT de las hojas de *S. herzogii* (Fig. 2.25).

#### 2.4.3. Utilidad de los resultados obtenidos en los experimentos de tolerancia:

En síntesis, el enriquecimiento con nutrientes incrementó la tolerancia de *S. herzogii* a los metales. Tales efectos tienen importantes implicancias en la utilización de humedales construidos para el tratamiento de efluentes industriales. El incremento en la tolerancia puede determinar la factibilidad de utilizar humedales construidos para el tratamiento de efluentes permitiendo el crecimiento de las macrófitas a concentraciones de metales que podrían impedir su desarrollo de no mediar el enriquecimiento. Incluso en humedales en los cuales las macrófitas flotantes se desarrollan sin adición de nutrientes, el enriquecimiento mejoraría la remoción debido al aumento de la producción y biomasa de las macrófitas, pero también incrementando la actividad biológica en la rizósfera para alcanzar una mayor retención en la fracción detrítica. En función de los resultados expuestos se decidió aumentar la

concentración de nutrientes en el humedal definitivo mezclando el efluente cloacal de la fábrica con el efluente industrial.