

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



INFORME FINAL DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Tolerancia y eficiencia de *Typha domingensis* Pers. en la
retención de metales y nutrientes de efluentes industriales.**

TESISTA: Lic. María de las Mercedes Mufarrege

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Ma. Alejandra Maine

CODIRECTOR DE TESIS: Dr. Hernán R. Hadad

Lugar de realización: Química Analítica, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.

I. PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE LA TESIS:

- Hadad, H.R., Maine, M.A., Pincirolí, M., Mufarrege, M.M. 2009. Nickel and phosphorous sorption efficiencies, tissue accumulation kinetics and morphological effects on *Eichhornia crassipes*. *Ecotoxicology*. 18(5): 504-513.
- Mufarrege, M., Hadad, H.R., Maine, M.A. 2010. Response of *Pistia stratiotes* to heavy metals (Cr, Ni, and Zn) and phosphorous. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58(1): 53-61.
- Hadad, H.R., Mufarrege, M.M., Pincirolí, M., Di Luca, G.A., Maine, M.A. 2010. Morphological response of *Typha domingensis* to an industrial effluent containing heavy metals in a constructed wetland. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58(3): 666-675.
- Mufarrege, M.M., Di Luca, G.A., Hadad, H.R., Maine, M.A. 2011. Adaptability of *Typha domingensis* to high pH and salinity. *Ecotoxicology*. 20: 457-465.
- Hadad, H.R., Maine, M.A., Mufarrege, M.M., del Sastre, M.V., Di Luca, G.A. 2011. Bioaccumulation kinetics and toxic effects of Cr, Ni and Zn on *Eichhornia crassipes*. *Journal of Hazardous Materials*. 190: 1016-1022.
- Di Luca, G.A., Mufarrege, M.M., Sánchez, G.C., Hadad, H.R., Maine, M.A. 2011. P distribution in different sediment fraction of a constructed wetland. *Water, Science and Technology*. 63(10): 2374-2380.
- Di Luca, G.A., Maine, M.A., Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Sánchez, G.C., Bonetto, C.A. 2011. Metal fractionation in the sediment of a constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Ecological Engineering*. 37: 1267-1275.

Capítulos de libros:

- Hadad, H.R., Mufarrege, M.M., Pincirolí, M., Di Luca, G., del Sastre, V., Maine, M.A. 2008. Macrophyte morphological response to the industrial effluent toxicity in a constructed wetland. In: *Wetlands: Ecology, Conservation and Restoration* (Russo, R.E. ed.) Nova Science Publishers. New York. pp. 295-323. 446 pp. ISBN: 978-1-60456-995-7.

II. PRESENTACIONES A CONGRESOS REALIZADAS DURANTE LA TESIS:

Congresos nacionales:

- Mufarrege, M. M., Hadad, H. R. y M. A. Maine. Tolerancia de *Typha domingensis* Pers. a condiciones de alta alcalinidad y salinidad. Libro de resúmenes del 11º Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL. Santa Fe, 10-11 de octubre, 2007.
- Mufarrege, M.M., Hadad, H. y Maine, M. A. Efectos de altas concentraciones de metales pesados (Cr, Ni y Zn) sobre la morfología de *Typha domingensis*. 12º Encuentro de Jóvenes Investigadores. UNL-UCSF-UTN. Santa Fe, 15 y 16 de octubre, 2008.
- Mufarrege, M. M., Hadad, H. R., Maine, M. A. Respuesta morfológica de *Typha domingensis* bajo condiciones de alta salinidad y alcalinidad. Libro de resúmenes del IV Congreso Argentino de Limnología. Asoc. Arg. de Limnología. Bariloche, 26-30 de octubre, 2008. Pág. 134.
- Mufarrege, M.M., Hadad, H. R., Di Luca, G.A., Maine, M.A. Respuesta de *Typha domingensis* Pers. expuesta a altas concentraciones de metales. Libro de trabajos del Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental. Mar del Plata. 26-28 de noviembre, 2008. Ed. Suárez. Pág. 164.
- Maine, M.A., Hadad, H.R., Sánchez, G., Caffaratti, S., Pedro, M.C., Mufarrege, M., Di Luca, G. Wetland para Tratamiento de efluentes de Industrias Metalúrgicas. II Jornadas Red Vitec. Paraná, 19 y 20 de noviembre, 2008. Trabajo completo.
- Hadad, H.R., Maine, M.A., Pinciroli, M., Mufarrege, M.M. Cinética de bioacumulación y efectos del Ni y P sobre *Eichhornia crassipes*. Reunión Argentina de Ecología. ASAE-UNSL. San Luis, 25-28 de noviembre, 2008. Pág. 276.
- Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Di Luca, G.A., Maine, M.A. Adaptabilidad de *Typha domingensis* a elevados pH y salinidad. Libro de Resúmenes de las X Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral. II Reunión Argentina de Ciencias Naturales. Santa Fe, 18-21 de octubre, 2009. Pág. 21.
- Maine, M.A., Hadad, H.R., Sánchez, G.C., Caffaratti, S.E., Pedro, M.C., Mufarrege, M.M., Di Luca, G.A. ¿Mejora la eficiencia de un wetland construido al alcanzar su madurez? Libro de Resúmenes del 17º Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente. “Nuevas Metas. Antiguos y Nuevos Desafíos”. Buenos Aires, 21-23 de abril, 2010.

- Mufarrege, M.M., Di Luca, G.A., Hadad, H.R., Maine, M.A. Exposición de *Typha domingensis* a una solución combinada de Cr, Ni y Zn. Libro de Resúmenes del III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental. Santa Fe, 12-14 de mayo, 2010. Pág. 45.
- Di Luca, G.A., Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Maine, M.A. ¿Influye *Typha domingensis* en la acumulación y especiación de Cr, Ni y Zn en sedimentos? Libro de Resúmenes del III Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental. Santa Fe, 12-14 de mayo, 2010. 8-9 pp.
- Di Luca, G.A., Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Maine, M.A. Evaluación de la disponibilidad de Cr, Ni y Zn en sedimentos de un humedal construido a través de un método de extracción secuencial. Libro de Resúmenes del “6° Congreso argentino de química analítica”, FIQ-FBCB (UNL). Santa Fe. 26-29 septiembre, 2011. P6-06 pp.

Congresos internacionales:

- Mufarrege, M. M., Pinciroli, M., Hadad, H. R., Maine, M. A. Efectos de un efluente cloacal e industrial sobre la morfología interna de raíces de *Typha domingensis* Pers. en un humedal construido. Libro de resúmenes de las XV Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo. Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay, 24-26 de octubre, 2007.
- Maine, M. A., Hadad, H. R., Sánchez, G. C., Caffaratti, S. E., Pedro, M. C. Mufarrege, M. M., Di Luca, G. Humedal construido para la depuración de efluentes industriales. Libro de trabajos completos del II Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento Integral del Agua. UNC-ProDTI (Sevilla, España). Córdoba, 5-7 de noviembre, 2008. 464-473 p. ISBN 978-987-1253-44-9.
- Maine, M. A., Hadad, H. R., Sánchez, G. C., Caffaratti, S. E., Pedro, M.C., Mufarrege, M. M., Di Luca, G. A., Bonetto, C. Contaminant removal in a constructed wetland for industrial wastewater treatment. 3rd Wetland Pollutant Dynamics and Control, WETPOL 2009. Barcelona, 20-24 de septiembre, 2009 (Bayona, J.M., García, G., eds.). 261-262 pp. ISBN 978-84-692-5587-2.
- Mufarrege, M.M, Hadad, H.R, Di Luca, G.A., Maine, M.A. The effects of heavy metal on the tolerance and root anatomy of *Typha domingensis*. 3rd. Wetland Pollutant

- Dynamics and Control, WETPOL 2009. Barcelona, 20-24 de septiembre, 2009 (Bayona, J.M., García, G., eds.). 337-337 pp. ISBN 978-84-692-5587-2.
- Di Luca, G.A., Maine, M.A., Sánchez, G.C., Hadad, H.R., Mufarrege, M.M. 2009. Fate of metals (Cr, Ni, Zn and Fe) in the sediment of a constructed wetland. 3rd Wetland Pollutant Dynamics and Control, WETPOL 2009. Barcelona, 20-24 de septiembre, 2009 (Bayona, J.M., García, G., eds.). 275-276 pp. ISBN 978-84-692-5587-2.
- Maine, M.A., Hadad, H.R., Sánchez, G., Caffaratti, S., Pedro, M.C., Di Luca, G.A., Mufarrege, M.M. Can the removal efficiency of a constructed wetland be affected by an event of plant depredation? 12th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control. IWA.Venice (Italy), 4-8 Octubre, 2010. Palombi Ed. (2):1385-1391 pp. ISBN 978-88-6060-300-5.
- Di Luca, G.A., Mufarrege, M.M., Sánchez, G.C., Hadad, H.R., Maine, M.A. P distribution in different sediment fraction of a constructed wetland. 12th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control. IWA. Venice (Italy), 4-8 Octubre, 2010. Palombi Ed. (1): 291-298 pp. ISBN 978-88-6060-300-5.
- Maine, M.A., Hadad, H.R., Sánchez, G.C., Caffaratti, S.E., Pedro, M.C., Mufarrege, M.M., Di Luca, G.A. Eficiencia de un wetland construido al alcanzar su madurez. Libro de Resúmenes del 32º Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (AIDIS). Punta Cana, 07-11 de noviembre, 2010.
- Di Luca, G.A., Mufarrege, M.M., Sánchez, G.C., Hadad, H.R., Maine, M.A. Remoción y acumulación de P en el sedimento de un humedal construido para tratamiento de efluentes industriales. III Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento Integral del Agua. UNC-ProDTI (Sevilla, España). Córdoba, 6-8 Octubre, 2010 (Rodríguez, M.E., Ardila Arias, A.N., eds.), 181-189 pp.
- Di Luca, G.A., Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Maine, M.A. Acumulación y especiación de altas concentraciones de Cr, Ni y Zn en un sistema acuático vegetado y no vegetado. Libro de Resúmenes del VI Congreso Iberoamericano de física y Química Ambiental. Sociedad Iberoamericana de Física y Química Ambiental (SiFyQA). Cancún, 25-29 de abril, 2011.
- Mufarrege, M.M., Di Luca, G.A., Hadad, H.R., Maine, M.A. Adaptability of *Typha domingensis* to environments with high pH and salinity. Libro de Resúmenes del 11th International Conference on Salt Lake Research. International Society for Salt Lake

- Research (ISSLR), PROMAR-Ctro. de Zoología Aplicada (UNC), Fundación Mar. Miramar, Córdoba, 9-14 de mayo, 2011. pp. 49-50.
- Di Luca, G.A., Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Maine M.A. Influence of *Typha domingensis* in the accumulation and speciation of high concentrations of Cr, Ni, and Zn in the sediment of a constructed wetland. Libro de Resúmenes del “Joint meeting of society of wetland scientists, wetpol and wetland and biogeochemistry symposium”, Praga, Rep. Checa. 3–8 July 2011. pp. 423.
- Maine, M.A., Hadad, H.R., Sánchez, G.C., Caffaratti, S.E., Pedro, M.C., Di Luca, G.A., Mufarrege, M. M. Removal efficiency of a constructed wetland in presence and absence of macrophyte aboveground parts. Libro de Resúmenes del “Joint meeting of society of wetland scientists, wetpol and wetland and biogeochemistry symposium”, Praga, Rep. Checa. 3–8 July 2011. pp. 188.
- Mufarrege, M.M., Di Luca, G.A., Hadad, R.H., Maine, M.A. Tolerancia de *Typha domingensis* a altas concentraciones de Ni y Cr. Libro de Resúmenes del “X Congreso de SETAC-LA”, Sociedad de Toxicología y Química Ambiental Latinoamericana. Cumaná, Venezuela. 11-15 octubre, 2011. p. 72.
- Hadad, H.R., Maine, M.A., Mufarrege, M.M., Di Luca, G.A. Cinética de bioacumulación y efectos tóxicos de Cr, Ni y Zn sobre *Eichhornia crassipes*. Libro de Resúmenes del “X Congreso de SETAC-LA”, Sociedad de Toxicología y Química Ambiental Latinoamericana. Cumaná, Venezuela. 11-15 octubre, 2011. p. 73.
- Di Luca, G.A., Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Maine, M.A. Dinámica de Cr en el sedimento de sistemas acuáticos con y sin vegetación. Libro de Resúmenes del “X Congreso de SETAC-LA”, Sociedad de Toxicología y Química Ambiental Latinoamericana. Cumaná, Venezuela. 11-15 octubre, 2011. p. 134.
- Maine, M.A., Sánchez, G., Hadad, H.R., Di Luca, G.A., Mufarrege, M.M., Caffaratti, S., Pedro, M.C. Wetland construido para tratamiento final de efluentes de cromado. Libro de Resúmenes del II Congreso Internacional de Ambiente y Energías Renovables (CAyER). Villa María, Córdoba. 9-11 Noviembre, 2011. 530-537 pp. (en CD). ISBN: 978-987-1253-89-0.

III. RESUMEN

Tolerancia y eficiencia de Typha domingensis Pers. en la retención de metales y nutrientes de efluentes industriales.

Se construyó un wetland para tratamiento de efluentes que contienen Cr, Ni, Zn, (efluente industrial), P y N (efluente cloacal), además de elevados pH y salinidad. Después de un período de dominancia de especies flotantes, *T. domingensis* resultó ser la especie dominante por varios años hasta la actualidad tolerando las condiciones del sistema. Por esta razón, en esta tesis se estudió su tolerancia a las condiciones del sistema y su eficiencia en la retención de los contaminantes. En experiencias de invernadero, se evaluó su respuesta al ser expuesta a condiciones extremas de pH y/o salinidad y a diferentes concentraciones de metales. Finalmente, se evaluó la capacidad de biosorber metales de sus hojas secas. Paralelamente, se monitoreó el humedal construido, determinando metales y nutrientes en diferentes órganos vegetales, en los efluentes y en el sedimento de la zona de entrada y de salida, así como también la tolerancia de las plantas a las condiciones del sistema. Respecto de la salinidad y el pH, se comprobó que las plantas del humedal construido adquirieron adaptaciones fisiológicas y morfológicas para tolerar elevados valores. Las adaptaciones de las plantas del humedal construido fueron demostradas por una mayor tasa de crecimiento relativo y un incremento en la concentración de clorofila, en comparación con los obtenidos en plantas provenientes de un humedal natural que fueron expuestas a las mismas condiciones. Contrariamente, las plantas del humedal construido mostraron estrés cuando fueron expuestas a condiciones de pH y salinidad que son generalmente encontradas en aguas de humedales naturales. Respecto de la exposición a metales, cuando *T. domingensis* se sometió a concentraciones combinadas de metales se observó que las raíces disminuyeron sus áreas transversales y su número de vasos metaxilemáticos, aumentando estos últimos su área. Cuando *T. domingensis* fue sometida a altas concentraciones de metales, las hojas alcanzaron concentraciones de los mismos similares a las de raíces, determinándose que esto se debió a que las partes basales de las hojas que estuvieron en contacto directo con la solución sorbieron los metales. En los tratamientos con concentraciones de 500 mg L⁻¹ de metales por separado y de metales combinados se observó una menor remoción en agua, por lo que se concluyó que *T. domingensis* toleró esa concentración de metales debido a que dejó de acumularlos, posiblemente para evitar que estas condiciones causen daños irreversibles. Por otro lado, las partes sumergidas de las hojas fueron un compartimiento muy eficiente

para la acumulación de metales y P, debido a que estos tejidos se encuentran en contacto directo con la solución experimental. Las plantas no toleraron la exposición a $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}$ y $500 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}$ y la combinación de $500 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr} + 500 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni} + 500 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}$ y tampoco a los tratamientos de $600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}$ y $600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr} + 600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni} + 600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}$. Además, se realizaron experimentos para evaluar la eficiencia de remoción de metales de agua por hojas secas de *T. domingensis*. La alta eficiencia de remoción de metales alcanzada en soluciones multimetales permitiría proponer que cuando las hojas de *T. domingensis* sean cosechadas durante las operaciones de mantenimiento de un wetland construido, podrían ser utilizadas como un material biosorbente eficiente, dándole una disposición final a estos residuos. Respecto del estudio del humedal construido, se observó que el mismo presentó diferentes etapas de cobertura de *T. domingensis* debido a eventos de depredación por animales herbívoros y a acciones de manejo, aún así, el sistema siempre mostró una buena eficiencia. *T. domingensis* demostró una alta eficiencia en la retención de metales y nutrientes y una elevada tolerancia a las condiciones de los efluentes tratados debido a su capacidad de adaptación.

IV. SUMMARY

*Tolerance and efficiency of *Typha domingensis* Pers. in the retention of metals and nutrients from industrial effluents.*

A wetland was constructed for the treatment of effluents that contain Cr, Ni, Zn (industrial effluent), P and N (sewage effluent), as well as high pH and salinity. After of a dominance period of floating species, *T. domingensis* was the dominant since several years to the present, tolerating the conditions of the system. Therefore, in this thesis its tolerance to the conditions of the system and its efficiency in the contaminant retention were studied. In greenhouse experiments the responses to extreme conditions to pH and/or salinity and to different metal concentrations were evaluated. Lastly, the capacity of metal biosorption by dry leaves was evaluated. In parallel, the constructed wetland was monitored by determining metals and nutrients in different plant organs, and in effluents and sediments of the inlet and outlet zones, as well as, the plant tolerance to the conditions of the system was studied. Regarding salinity and pH, it was probed that the plants from the constructed wetland acquired physiological and morphological adaptations to tolerate high values. The adaptations of the plants from the constructed wetland were demonstrated by a higher relative growth rate and an increase in the chlorophyll concentration in comparison with the values obtained in plants from a natural wetland exposed to the same conditions. Contrary, the plants from the constructed wetland showed stress when they were exposed to conditions of pH and salinity generally observed in waters from natural wetlands. Regarding the metal exposition, when *T. domingensis* was subjected to combined metal treatments, it was observed that the plants decreased the cross-sectional area of roots and metaxilematic vessels and the number of vessels. When *T. domingensis* was subjected to high metal concentrations the leaves showed similar concentrations to the registered in roots because the lower parts of leaves, which were in direct contact with the solution, sorbed the metals. In treatments with concentrations of 500 mg L^{-1} of single and combined metals it was observed a lower removal from water. It was concluded that *T. domingensis* tolerate these treatments because it stopped the metal accumulation to avoid irreversible damages. On the other hand, the submerged parts of the leaves were a very efficient compartment for the accumulation of metals and P, because these tissues are in direct contact with the experimental solution. Plants do not tolerate the exposure to 100 mg L^{-1} Ni and 500 mg L^{-1} Ni and the combination of 500 mg L^{-1} Cr + 500 mg L^{-1} Ni + 500 mg L^{-1} Zn and neither the treatments 600 mg L^{-1} Ni and 600 mg L^{-1}

$1 \text{ Cr} + 600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni} + 600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}$. Besides, experiments were conducted to evaluate the efficiency of metal removal from water by the dried leaves of *T. domingensis*. The high efficiency in metal removal achieved in multimetal solutions would propose that when the leaves of *T. domingensis* are harvested during the maintenance of a constructed wetland, this material could be used as an efficient biosorbent, giving a final disposal of these wastes. Regarding the constructed wetland study, it was observed different stages of *T. domingensis* cover due to predation events by herbivores and management actions, even so, the system always showed a good efficiency. *T. domingensis* proved a high efficiency in the nutrient and metal retention and a high tolerance to the conditions of the treated effluents due to its adaptation ability.

Índice:

	Página
I. Publicaciones obtenidas durante la tesis.....	2
II. Presentaciones a congresos realizadas durante la tesis.....	3
III. Resumen.....	7
IV. Summary.....	9
<i>Índice</i>	11
V. Introducción.....	13
V.I. Los metales en los sistemas biológicos.....	14
V.II. Mecanismos de captación y transformación de los elementos traza por los seres vivos.....	16
V.III. Mecanismos de toxicidad.....	17
V.IV. Mecanismos de defensa y detoxificación.....	18
V.V. Características de los metales a estudiar.....	20
V.VI. Remediación de ambientes contaminados con metales.....	22
V.VII. Estado actual del conocimiento del tema.....	25
VI. Hipótesis y Objetivos.....	33
VI.I. Hipótesis.....	34
VI.II. Objetivos.....	35
VI.II.I. Objetivo general.....	35
VI.II.II. Objetivos específicos.....	35
VII. Materiales y Métodos.....	36
VII.I. Experiencias de invernadero.....	37
VII.I.I. Descripción botánica de la especie estudiada.....	38
VII.I.II. Estudios a campo.....	38
VII.I.III. Humedal construido.....	38
VII.I.IV. Humedales naturales.....	40
VII.II. Determinaciones analíticas.....	43
VII.II.I. Determinación de parámetros físico-químicos en agua.....	43
VII.II.II. Determinación de parámetros químicos en sedimento y vegetales.....	46
VII.III. Estudio de la vegetación.....	47
VII.III.I. Biomasa y crecimiento.....	48
VII.III.II. Concentración de clorofila.....	48
VII.III.III. Estudio de la morfología interna.....	49
VII.III.IV. Análisis de rayos X y microscopía electrónica de barrido (MEB)...	49
VII.IV. Análisis estadístico.....	49
Capítulo 1. Tolerancia de <i>Typha domingensis</i> a distintas condiciones de pH y salinidad.....	51
1.1. Introducción.....	52
1.2. Experiencia 1: Estudio preliminar de tolerancia al pH y salinidad.....	52
1.2.1. Objetivos.....	52
1.2.2. Metodología.....	52
1.2.3. Resultados.....	54
1.2.4. Consideraciones finales de la experiencia preliminar.....	58
1.3. Experiencia 2: Adaptabilidad de plantas de <i>T. domingensis</i> provenientes de un humedal construido y de un humedal natural a elevados pH y salinidad.....	58
1.3.1. Objetivo.....	58
1.3.2. Metodología.....	59
1.3.3. Resultados.....	60
1.3.4. Consideraciones finales.....	68
1.4. Discusión del capítulo.....	69
Capítulo 2. Estudio de la tolerancia y eficiencia de la acumulación de metales de <i>T.</i>	

<i>domingensis</i>	72
2.1. Introducción.....	73
2.2. Experiencia N° 1: Estudio preliminar de la tolerancia a metales.....	73
2.2.1. Objetivo.....	73
2.2.2. Metodología.....	73
2.2.3. Resultados.....	76
2.2.4. Consideraciones finales.....	84
2.3. Experiencia N° 2: Estudio de la distribución de Cr, Ni y Zn en tejidos de <i>T. domingensis</i> a lo largo del tiempo.....	85
2.3.1. Objetivo.....	85
2.3.2. Metodología.....	85
2.3.3. Resultados.....	87
2.3.4. Consideraciones finales.....	96
2.4. Experiencia N° 3: Estudio de la respuesta de <i>T. domingensis</i> a altas concentraciones de metales y fósforo.....	97
2.4.1. Objetivo.....	97
2.4.2. Metodología.....	97
2.4.3. Resultados.....	99
2.4.4. Consideraciones finales.....	110
2.5. Experiencia N° 4: Estudio de la tolerancia de plantas de <i>T. domingensis</i> a mayores concentraciones de metales y nutrientes.....	111
2.5.1. Objetivo.....	111
2.5.2. Metodología.....	111
2.5.3. Resultados.....	112
2.5.4. Consideraciones finales.....	116
2.5.5. Discusión del capítulo.....	117
Capítulo 3. Estudios en un wetland construido y en un wetland natural.....	122
3.1. Introducción.....	123
3.2. Metodología.....	124
3.2.1. Características del humedal construido.....	124
3.2.2. Análisis realizados.....	124
3.2.3. Estudios de la vegetación.....	125
3.2.4. Estudios en humedales naturales.....	125
3.2.5. Determinaciones analíticas.....	126
3.2.6. Análisis estadístico.....	126
3.3. Resultados.....	126
3.3.1. Cambios en la cobertura por perturbaciones externas.....	126
3.3.1.1. Eficiencia del wetland construido en la etapa de depredación de carpinchos.....	128
3.3.2. Eficiencia del wetland.....	130
3.3.3. Acumulación de contaminantes en tejidos vegetales y en sedimento....	130
3.3.4. Estudios de la vegetación.....	133
3.4. Discusión del capítulo.....	140
3.5. Consideraciones finales.....	146
Capítulo 4. Estudio de la eficiencia de hojas secas de <i>T. domingensis</i> como material biosorbente.....	147
4.1. Introducción.....	148
4.2. Objetivo.....	148
4.3. Metodología.....	148
4.4. Resultados.....	150
4.5. Discusión del capítulo.....	153
4.6. Consideraciones finales.....	155
IV. Conclusiones.....	157
V. Bibliografía.....	161

V. INTRODUCCIÓN

V.I. Los metales en los sistemas biológicos

El rápido crecimiento de la población mundial y la consecuente demanda de recursos se reflejan en los problemas medioambientales que afectan a todo el planeta, como la destrucción de la capa de ozono, el efecto invernadero, el agotamiento de los recursos, la desertización y otros. Si bien durante millones de años muchas especies han evolucionado y se han adaptado a cambios naturales, en la actualidad la mayoría de los hábitats del mundo están cambiando tan rápidamente que las especies no tienen el tiempo suficiente para evolucionar o adaptarse a tales cambios. Es muy difícil para los seres vivos adaptarse a materiales contaminantes liberados al ambiente como producto de las actividades humanas.

Por ejemplo, la presencia de metales se ha incrementado sustancialmente en el ambiente durante las últimas décadas. Los metales se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre, en forma de minerales, sales u otros compuestos. No pueden ser degradados de forma natural o biológica (Barán, 1995; Deer et al., 1996; Abollino et al., 2002).

Permanentemente, se arrojan miles de toneladas de contaminantes metálicos al aire, al suelo y al agua, como consecuencia de la utilización de combustibles fósiles, de actividades industriales, de minería, etc. Los metales producen serias formas de contaminación en sistemas acuáticos ya que no se degradan como lo hacen los orgánicos (Schoeder, 1973). Muchos iones metálicos forman quelatos o complejos orgánicos que tienden a concentrarse en las redes tróficas y pueden actuar como tóxicos acumulativos. Es por ello que la eliminación de los contaminantes de los residuos líquidos que serán vertidos al ambiente es necesaria. Entre estos metales se encuentran zinc, níquel y cromo, contaminantes ubicuos en efluentes industriales, agrícolas y municipales en nuestra región.

Los seres vivos habitamos en un entorno esencialmente inorgánico y a través de distintas etapas de la evolución debimos adaptarnos a ese entorno y aprendimos a utilizarlo para nuestro mejor desarrollo. En la actualidad, 27 elementos se reconocen como esenciales. De estos elementos, aparte del carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, que son constituyentes básicos y característicos de los compuestos orgánicos, todos los demás son elementos típicamente inorgánicos. Estos elementos pueden ser divididos en tres grandes grupos, de acuerdo a su abundancia en los sistemas biológicos. En el primer grupo, se ubican los mayoritarios los que representan más del 98 % del peso de un humano adulto, éstos son: C, H, N, O y además Na, K, Mg, Ca, Cl, S y P. En el segundo grupo, se incluyen los elementos trazas como Fe, Zn, Si, F y Br. En el tercer grupo, se ubican los elementos micro-

traza, o ultra-micro-traza. En este grupo se ubican elementos cuyas concentraciones son sumamente bajas pero de esencialidad reconocida (Mo, I, Co) y otros cuyas concentraciones y/o funciones todavía no están claramente establecidas (Cr, Ni, As, V) (Baran, 1995; Newman, 1998). La Tabla V.1 muestra las concentraciones de macroelementos y microelementos que generalmente se encuentran en plantas superiores (Baran, 1995; Bonilla, 2008).

Tabla V.1. Concentración usual de los elementos en las plantas superiores.

Macroelementos	mg por 100 g de materia seca
Carbono	45,0
Oxígeno	45,0
Hidrógeno	6,0
Nitrógeno	1,5
Calcio	0,5
Potasio	1,0
Azufre	0,1
Fósforo	0,2
Magnesio	0,2
Microelementos	
Boro	2,0
Cloro	10,0
Cobre	0,6
Hierro	10,0
Manganeso	5,0
Molibdeno	0,01
Zinc	2,0
Níquel	0,3

Los elementos que ingresan al medio ambiente pueden ser clasificados en tóxicos y no-tóxicos. De cualquier forma un elemento esencial puede transformarse en tóxico, cuando se sobrepasan ciertos límites de concentración. En el caso de una especie tóxica, el efecto fisiológico es siempre negativo cualquiera sea la dosis del elemento.

Los efectos tóxicos de los metales sobre las plantas pueden ser caracterizados por los siguientes procesos: producción de especies reactivas de oxígeno por autooxidación bloqueo de grupos funcionales esenciales en biomoléculas, y desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas (Gasic y Korban, 2006).

V.II. Mecanismos de captación y transformación de los elementos traza por los seres vivos.

Captación de cationes

Se han propuesto dos modelos moleculares simples, para explicar la captación de iones metálicos por las células que son la quelación y el intercambio iónico (Baran, 1985). Un proceso simple propuesto es una adsorción superficial del metal (a) o bien la posibilidad de que el sistema biológico ofrezca al medio un agente quelante externo L, para capturar al elemento (b). Ambos procesos deben ser seguidos por el pasaje del elemento capturado hacia el interior de la célula, donde eventualmente, puede ser retenido por otro ligando L' (c, d)



Pueden ocurrir procesos redox antes de la transferencia del catión al interior de la célula o después de ella. Y, finalmente, el quelato ML' puede constituir la vía de transporte del elemento a otro sitio celular, donde se genera un nuevo complejo ML''(e).

Todos los procesos llegan rápidamente al equilibrio y deben estar sometidos a control cinético y termodinámico. Obviamente, en los procesos de selección del catión entran en juego efectos relacionados con la carga y el tamaño de los iones, a sus preferencias por ciertos tipos de ligandos (centros duros o blandos), así como a las propiedades redox de los sistemas involucrados.

En el intercambio iónico, los sitios ligantes se unen al grupo intercambiable a través de fuerzas electrostáticas y esta interacción es la única responsable de la selectividad. La fuerza relativa de la unión electrostática condiciona el desplazamiento de un grupo por otro (Barán, 1995).

Captación de aniones

Mientras que para muchos cationes, la captación e incorporación ocurre sin cambios en sus estados de oxidación, en el caso de los elementos no metálicos, presentes naturalmente como oxoaniones, estos procesos generalmente involucran tales cambios, como por ejemplo:



La raíz constituye el tejido de entrada principal de metales pesados en la planta. Hasta allí los metales pesados pueden llegar, fundamentalmente, por un proceso de difusión en el medio, mediante un flujo masivo y por intercambio catiónico (Ahrland, et al., 1958; Suñé, et al., 2007). La raíz posee cargas negativas en sus células, debido en gran medida a la presencia de grupos carboxilo del ácido péctico. Las cargas negativas de estas células de la rizodermis interaccionan con las positivas de los metales pesados presentes en el suelo, creando un equilibrio dinámico que facilita la entrada hacia el interior celular. De esta forma, los cationes entran por la pared celular, que además es hidrofílica, lo que facilita el transporte iónico. Una vez unidas las cargas positivas a las negativas de la pared celular, los metales pesados se transportan, en parte por la vía apoplástica, y en parte por la simplástica. No obstante, se ha demostrado recientemente que parte del flujo de metales pesados, al menos en el caso del Pb puede quedar retenido en la pared celular por la estructura de lignina y celulosa (Marmioli et al., 2005).

V.III. Mecanismos de toxicidad

En general los mecanismos de toxicidad originados por metales están asociados a uno o más de los siguientes procesos:

- El bloqueo de un grupo funcional esencial de alguna biomolécula, incluyendo enzimas o polinucleótidos.
- El desplazamiento de un metal esencial de una biomolécula.
- La modificación estructural de algún sitio activo importante.

- La ruptura de biomembranas.

La actividad de los sistemas biológicos, en su mayoría, está ligada con la presencia de sitios metálicos coordinados a residuos de aminoácidos (nitrógenos imidazólicos, grupos carboxilatos, sulfhidrilos, etc.). Consecuentemente, el metal invasor puede desplazar al esencial de esa posición de coordinación tornando inactivo al sistema.

V.IV. Mecanismos de defensa y detoxificación

A nivel celular, las plantas tienen una amplia gama de posibles mecanismos que participan en la detoxificación y, por tanto, en la tolerancia al estrés por metales. Importantes componentes de la homeostasis de metales y los sistemas de desintoxicación son, la membrana basada en los transportadores de metales (Williams et al., 2000), chaperones intracelulares del metal para la distribución eficiente de los escasos metales esenciales, la quelación (Cobbett y Goldsbrough, 2002), y los procesos de captura. La pérdida de cualquiera uno de estos procesos críticos conducirá a la hipersensibilidad a los iones de metales. Dependiendo de sus estados de oxidación, los metales pueden ser altamente reactivos, dando lugar a toxicidad en la mayoría de los organismos.

Muchas especies de plantas toleran elevadas concentraciones de metales en el suelo porque restringen su absorción y translocación hacia las hojas evitando que se produzcan daños en estos órganos que son imprescindibles para la reproducción mediante el proceso de floración, lo que les permite mantener concentraciones constantes y relativamente bajas en la biomasa aérea independientemente de la concentración metálica del suelo. Sin embargo, otras absorben los metales activamente a partir del suelo y los acumulan en formas no tóxicas en su biomasa aérea (estrategia acumuladora).

Se conocen diferentes mecanismos de detoxificación en los organismos y se pueden clasificar como: tolerancia, evasión, adaptación, resistencia y defensa (Barán, 1995):

Tolerancia: acepta y tolera la presencia del elemento tóxico.

Evasión: evita interactuar con el elemento porque posee un mecanismo para repelerlo o porque se desplaza del sitio contaminado.

Adaptación: implica cambios genéticos inducidos por la reiterada exposición al elemento tóxico, de manera tal que el organismo se vuelve resistente al mismo o encuentra maneras de tolerarlo o evitarlo.

Defensa: respuesta inmediata a la interacción con un agente tóxico y puede o no, implicar alteraciones genéticas. En la práctica no es fácil clasificar un proceso dentro de una categoría, por lo que se habla en general de mecanismos de defensa.

Se reconocen mecanismos típicos y de características bastante definidas como:

- La retención o absorción de metales tóxicos por las membranas celulares. Estos mecanismos son poco específicos y en ellos pueden participar, por ejemplo, las glicoproteínas y mucopolisacáridos que forman parte de esas membranas. Incluso alguna de estas biomoléculas pueden ser segregadas desde el interior de la célula, ante un aumento de la concentración de la especie tóxica en el entorno.
- La inmovilización de metales tóxicos en forma de gránulos o corpúsculos insolubles, corpúsculos de inclusión, que quedan fijados en ciertos tejidos y aíslan a la especie tóxica. Están constituidos por formaciones de capas concéntricas que contienen cantidades variables de calcio, magnesio, carbonato y fosfato junto a pequeñas proporciones de metales (Pb, Cd, Ag, Sn, Sr, Ba) que de esta manera quedan inmovilizados. Es un tipo particular de biominerales, resultantes de mecanismos de detoxificación. En general, la tolerancia a metales viene determinada por la reducción del transporte del mismo al interior de la célula y/o una mayor capacidad para secuestrar estos metales. La raíz constituye una de las principales barreras de defensa mediante la inmovilización del Cd por pectinas de la pared celular. Los carbohidratos extracelulares (mucílago y calosa) de la raíz también pueden intervenir en la inmovilización del metal (Benavides et al. 2005). La acumulación del metal en los tricomas de la superficie foliar también es un mecanismo de inmovilización y defensa celular (Salt et al. 1995).
- La transformación del elemento tóxico en una especie química no tóxica. Esto se denomina detoxificación química y un ejemplo interesante es la quelación de metales por parte de las metalotioneínas (proteínas de bajo peso molecular con un contenido inusual de átomos de azufre provenientes de residuos de cisteína). Se encontró que la síntesis de metalotioneínas aumenta considerablemente cuando el organismo se expone a sales de Cd (II) o Hg (II), lo que muestra con claridad su intervención en procesos de detoxificación (Barán, 1995). Una vez dentro de la célula, el Cd u otros metales, pueden ser secuestrados por ácidos orgánicos, aminoácidos, fitoquelatinas y metalotioneínas, y posteriormente compartimentalizados en la vacuola para prevenir su toxicidad. Las fitoquelatinas

constituyen uno de los principales mecanismos de defensa frente a metales pesados. Su síntesis tiene lugar a partir del glutatión y se induce en presencia de metales pesados (Clemens, 2006). Plantas que sobreexpresan la enzima fitoquelatina sintasa muestran una mayor tolerancia frente al Cd (Pomponi et al. 2006). Otras posibles moléculas responsables de la acumulación del cadmio son las metalotioneínas (MTs), pequeñas proteínas ricas en cisteína, si bien en las plantas no son las principales responsables de la detoxificación del cadmio, como ocurre en células animales (Hamer 1986).

V.V. Características de los metales a estudiar

Se ha encontrado que muchas plantas son sensibles a la toxicidad por metales, mientras que otras desarrollan ciertos mecanismos bioquímicos que evaden su acción tóxica; como son la deposición de metales sobre la pared celular, enlace a grupos -SH en el límite del citoplasma, o mediante su aislamiento en compartimientos, formando complejos con ácidos orgánicos, fenoles y otros compuestos orgánicos en la vacuola. Debido a que la toxicidad implica inactivación de enzimas vitales, los mecanismos de evasión mencionados, ofrecen una protección efectiva contra daños bioquímicos. La habilidad que tienen ciertas plantas de desarrollar resistencia contra daños ocasionados por metales, es un carácter fijado genéticamente, pero modificable por adaptación. Los quimo-ecotipos muestran isoenzimas particulares, que pueden resistir altas concentraciones de metales sin inactivarse. En ciertas plantas se ha hallado una correlación directa entre el grado de exposición a un metal pesado, y su tolerancia. Algunas de las plantas tolerantes a metales (metalófitas), se pueden utilizar inclusive como indicadoras de depósitos minerales cerca de la superficie y son también apropiadas para ser plantadas en áreas industriales y sujetas a minería.

Aunque cualquiera de los metales puede ser tóxico a las plantas a ciertos niveles de solubilidad, solamente pocos han sido observados como causantes de fitotoxicidad en suelos. En los suelos, muchos metales se encuentran como compuestos inorgánicos o están unidos a la materia orgánica, arcillas de óxidos hidratados de Fe, Mn y Al. Debido a la precipitación y absorción de muchos metales por los suelos, las toxicidades por Zn, Cu y Ni son las que han sido frecuentemente observadas. Las toxicidades por Pb, Co, Be, As y Cd ocurren solamente bajo condiciones especiales.

El Cr es introducido en los ecosistemas naturales como resultado de diferentes actividades industriales, como la industria del hierro y acero, el curtido de cuero, industrias

de cromado y otras fuentes de contaminación antropogénica. El Cr es utilizado en aleaciones, catalizadores, pigmentos, curtiembres y preservativos de la madera. Solo Cr(III) y Cr(VI) son significativos en sistemas biológicos, mientras que compuestos de Cr tetra o pentavalente pueden ocurrir como intermediarios reactivos de corta vida en reacciones redox. La forma más tóxica es la de Cr(VI), la cual es carcinogénica (Newman, 1998). El Cr(VI) se presenta como iones $\text{CrO}_4^{=}$ o $\text{Cr}_2\text{O}_7^{=}$. Contrariamente, el Cr(III) en forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos, es mucho menos móvil y generalmente se encuentra acomplejado a la materia orgánica en suelos o ambiente acuáticos. El Cr(VI) es un agente oxidante fuerte y en presencia de materia orgánica es rápidamente reducido a Cr(III). De cualquier forma, altas concentraciones de Cr(VI) pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y entonces persistir como contaminantes. En el ambiente, el Cr(III) es poco probable que sea oxidado a Cr(VI), esto podría ocurrir por ejemplo en presencia de grandes cantidades de Mn(V), transformándose nuevamente en la forma más tóxica. (McGrath y Smith, 1990; Vajpayee et al., 1999). El Cr(III) a elevadas concentraciones comienzan a competir con otros metales esenciales por los sitios activos de diversas biomoléculas (Baran, 1995).

El Zn es usado extensivamente en capas protectoras y galvanizados para prevenir corrosión y en aleaciones. Es menos tóxico que el Cr y Ni (Newman, 1998). En los ambientes acuáticos se encuentra como Zn(II). También puede encontrarse en los suelos, y es un nutriente requerido por las plantas para su desarrollo (Mahler, 2003). El Zn es parte esencial de enzimas como deshidrogenadas alcohólica, láctica y glutamina, y ciertas peptidasas como la carboxipeptidasa (Sívori et al., 1980).

El Ni es utilizado en aleaciones como la de acero inoxidable y en baños de niquelado. Posee también otros usos, como por ejemplo, la producción de baterías de Ni-Cd. A suficientemente altas concentraciones, el Ni es carcinogénico (Newman, 1998). En los ambientes acuáticos el estado de oxidación predominante del níquel es +2, pero también forma compuestos en los estados de oxidación +1, +3 y +4. La movilidad y biodisponibilidad del níquel en medio acuoso están influenciadas por factores ambientales tales como el pH, el potencial de oxido-reducción y la presencia de materia orgánica y de material particulado inorgánico (Callahan et al., 1979). En condiciones aeróbicas, a pH por debajo de 9, el Ni forma compuestos con iones hidroxilo, carbonato, sulfato y grupos orgánicos; en condiciones anaeróbicas y en presencia de azufre, se forman sulfuros de baja solubilidad. Los óxidos de hierro y manganeso adsorben el níquel (+2) y coprecipitan a pH mayor que 6 (CCME, 1996). La preeminencia de la especie iónica libre (Ni^{2+}) a pH = 7 y la

capacidad de acomplejarse con ligandos orgánicos evidencian la relativamente alta movilidad del níquel en los ambientes acuáticos, comparada con las de otros metales (Mills et al., 1985). El Ni es un elemento traza esencial para diferentes sistemas bacterianos. Las enzimas de Ni son especialmente prominentes en el metabolismo de bacterias anaeróbicas, por ejemplo en las bacterias metanogénicas (Baran, 1995).

Aunque para los organismos superiores el Cr y Zn son nutrientes esenciales y son imprescindibles bajas concentraciones de ellos, la exposición a elevadas concentraciones es tóxica. El Níquel no es un nutriente esencial para las plantas, probablemente la toma de este metal por las plantas es por afinidad de cargas, y generalmente se da en plantas que son llamadas “Hiperacumuladoras”, este termino se usa para referirse a plantas desarrolladas a campo capaces de acumular $>1.000 \text{ mg Ni kg}^{-1}$ las cuales toman el metal y lo inmovilizan generalmente en sus raíces ya sea acumulándola en vacuolas o reteniéndolas en las paredes celulares de la epidermis, estos son mecanismos de defensa de las plantas para evitar daños en tejidos vitales no solo para la reproducción sino también para el crecimiento y la realización de la fotosíntesis.

Algunos estudios recientes sugieren que la acumulación inusual de metales confiere a estas plantas la capacidad de limitar su depredación y las infecciones microbianas causantes de enfermedades vegetales (Pollard y Baker, 1997; Poschenrieder et al., 2006).

En plantas, concentraciones excesivas de Cr producen senescencia debida a la disminución de clorofila, proteínas, ácidos nucleicos y actividad de algunas enzimas (Soltan y Rashed, 2003), mientras que la exposición a cierto umbral de Ni y Zn produce signos de clorosis y disminución en la biomasa (Chaney, 1993; Loneragan y Webb, 1993; Monni et al., 2000). Sen y Bhattacharyya (1994) proponen que elevadas concentraciones de Ni son tóxicas para las macrófitas produciendo una disminución de clorofila, proteínas y aminoácidos.

V.VI. Remediación de ambientes contaminados con metales

Las medidas que se aplican para disminuir la contaminación industrial adoptadas tradicionalmente consisten en una serie de procesos físicos y químicos que logran la disminución de los contenidos de contaminantes que se verterán al ambiente. En cuanto a los efluentes líquidos industriales, las tecnologías de remediación que están actualmente en uso, tales como precipitación (Galil y Rebhum, 1990), reducción (Brewster y Passmore, 1994), membranas artificiales (Geckeler y Volchek, 1996) e intercambio iónico (Markus y Kertes, 1969), son costosas, relativamente ineficientes y en la mayoría de los casos generan una gran

cantidad de desechos de difícil disposición. Hace años se han propuesto técnicas de bioremediación usando bacterias (Ohtake et al., 1990; Coleman y Paran, 1991; etc.), suelos (Losi et al., 1994), algas (Brady et al., 1994) y plantas (Wolverton y Mc Donald, 1979; Martin y Coughtrey, 1982; de Wet et al., 1990; Delgado et al., 1993; Sen y Battacharyya, 1994; Dushenkov et al., 1995; Salt et al., 1997; Lytle et al., 1998; Maine et al., 1998; Schneider y Rubio, 1999). El uso de plantas o fitorremediación aparece como una opción altamente competitiva frente a otros métodos de tratamiento de aguas residuales. Los procesos englobados en la fitorremediación dependen del tipo de plantas y del contaminante a tratar, y pueden resumirse como:

Fitoextracción: uso de plantas acumuladoras de elementos tóxicos o compuestos orgánicos para retirarlos del agua, suelo o sedimento mediante su absorción y concentración en las partes cosechables.

Fitoestabilización: uso de plantas para reducir la biodisponibilidad de los contaminantes en el entorno, mejorando las propiedades físicas y químicas del medio. Obviamente la eficiencia del tratamiento dependerá en gran medida de las especies de plantas que se utilicen (Reddy, 1983, Gersberg et al., 1986).

Fitovolatilización: uso de plantas para eliminar los contaminantes del medio mediante su volatilización.

Fitodegradación: uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes orgánicos.

Rizofiltración: uso de raíces para absorber y adsorber contaminantes del agua y de otros efluentes acuosos.

Para tratar un efluente se necesitan plantas que presenten alta eficiencia y alta tolerancia a concentraciones elevadas del contaminante que se quiere eliminar. Se ha propuesto que las plantas pueden ser cosechadas y su tejido, rico en el contaminante acumulado, puede ser procesado para producir energía y los metales pueden ser recuperados de los residuos de las plantas después de un tratamiento ácido (Dushenkov et al., 1995). A pesar de que en muchos casos no es económicamente factible el reciclado de metales, sigue siendo más económico disponer de una pequeña cantidad de biomasa contaminada que de una gran cantidad de residuos sólidos o semisólidos. Las macrófitas no solamente sorben contaminantes cuando están vivas. Se ha demostrado que los tejidos de plantas secas pueden ser altamente eficientes en la retención de metales, actuando como resinas de intercambio

(Elifantz y Tel-Or, 2002; Miretzky et al., 2006; Verma et al., 2008; Abdel-Ghani et al., 2009). Schneider y Rubio (1999) demostraron a escala de laboratorio que la biomasa seca de las macrófitas *Potamogeton lucens* L., *S. herzogii* y *E. crassipes*, resultó un excelente biosorbedor de metales. Miretzky et al. (2006) reportaron similares resultados cuando trabajaron con biomasa no viva de *Spirodela intermedia*, *Lemna minor* y *P. stratiotes* utilizando una solución multimetal (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+}). La utilización de biomasa seca sería una importante ventaja para el manejo de humedales construidos, porque las macrófitas podrían ser cosechadas, secadas y como disposición final, utilizadas en columnas para la eliminación de metales en agua. Por otra parte, cuando mueren, como su degradación es lenta (Hammerly et al., 1989), seguirían reteniendo metales dentro del humedal.

El valle de inundación del Río Paraná Medio se caracteriza por sus zonas pantanosas, humedales o wetlands, donde se desarrollan una gran variedad de macrófitas. Entre las especies flotantes libres y emergentes de mayor dispersión y productividad se encuentran *Salvinia herzogii*, *Pistia stratiotes*, *Hydromistia stolonífera*, *Eichhornia crassipes*, *Typha domingensis*, *Scirpus californicus*, *Panicum elephantipes*, entre otras. Se ha propuesto la utilización de humedales naturales como sistemas de tratamiento de aguas residuales cloacales y domiciliarias, pero su uso podría traer aparejado daños ambientales. Otra desventaja de los wetlands naturales es que difícilmente estén disponibles en el lugar donde debe llevarse a cabo el tratamiento. Por ello, se ha implementado la utilización de wetlands o humedales construidos. Un wetland construido es un ambiente constituido por una zona deprimida donde se desarrollan plantas acuáticas flotantes y arraigadas sobre sedimentos permanentemente inundados donde se induce un flujo artificial de agua (Hammer y Bastion, 1989; De Luis Calabuig, 2001). El uso de wetlands construidos tiene muchas ventajas ya que pueden construirse donde se necesitan, dimensionarse de acuerdo a las necesidades del tratamiento, impermeabilizarse para evitar la contaminación de las napas son de bajo costo inicial de construcción, bajo costo anual de funcionamiento ya que no utilizan reactivos ni energía eléctrica. Los wetlands construidos además de eliminar eficientemente contaminantes, son proyectos amigables con el medio ambiente que proveen un hábitat para la vida silvestre ya que se los utiliza como tratamientos secundarios o terciarios.

Esta tecnología “natural” podríamos decir que “ha echado firmes raíces” para el tratamiento de aguas residuales en todo el mundo. A juzgar por el creciente número de humedales naturales y construidos utilizados para el tratamiento de aguas residuales, principalmente cloacales, estos sistemas constituyen una nueva y promisoriosa tecnología que ya ha sido aceptada en la mayor parte del mundo. Sin embargo, es un método de tratamiento

no tradicional y además su tecnología no está aún completamente entendida. El conocimiento de los procesos que regulan un wetland no está tan avanzado como para proveer modelos predictivos de funcionamiento detallados, ya que es un sistema natural sujeto a cambios climáticos y ciclos vegetativos (Cole, 1998). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones sobre el tema han sido realizadas en otros países del mundo, y fundamentalmente para el tratamiento de efluentes cloacales, donde los principales contaminantes a eliminar son nitrógeno y fósforo. En Argentina, la utilización de humedales representaría una práctica muy promisoriosa, ya que existe una baja densidad de población y gran disponibilidad de terrenos marginales de bajo costo para implementar esta técnica. Otro factor importante es que nuestra región tiene un clima templado, adecuado para desarrollar este tipo de sistemas. En países con clima frío, presentan dos problemas principales: fallas hidráulicas debidas al congelamiento o cambios en la viscosidad del efluente e inadecuada purificación debido a las bajas temperaturas (Jenssen et al., 1993).

La mayoría de los estudios que se han llevado a cabo hasta el momento en el mundo sobre macrófitas para eliminación de contaminantes, abocan sus esfuerzos en determinar las eficiencias de remoción de contaminantes o los efectos tóxicos que los contaminantes producen sobre las plantas, sin detenerse en los procesos por los cuales las macrófitas llevan a cabo la bioacumulación de metales, o los efectos que los contaminantes pueden causar a las plantas. En nuestro grupo de investigación, la Dra. Suñé ha realizado su tesis doctoral, determinando los mecanismos que utilizan las plantas para la remoción de metales. Estos mecanismos, que no son necesariamente los mismos para las diferentes especies de plantas y para los diferentes metales, incluyen sorción por raíces (una combinación de procesos físicos y químicos como quelación, intercambio iónico y precipitación química), procesos biológicos (translocación a la parte aérea y precipitación inducida por exudados de raíces o por microorganismos) (Suñé et al., 2007).

Determinar la tolerancia de las plantas a las condiciones del efluente a tratar (pH, salinidad, concentración de contaminantes) es un punto clave para optimizar el funcionamiento de estos ecosistemas construidos.

V.VII. Estado actual del conocimiento del tema

Respuestas de plantas de Typha sp. a contaminantes y elevados pH y salinidad

Se han realizado abundantes estudios en laboratorio, invernadero y a campo a fin de determinar las eficiencias de distintas plantas acuáticas, tanto flotantes como arraigadas, en la remoción de contaminantes de agua (Delgado et al., 1993; Soltan y Rashed, 2003; Miretzky et al., 2006; Maine et al., 2001, 2004; Hadad et al., 2007, 2011). Stoltz y Greger (2002) estudiaron la capacidad de acumulación de metales (As, Cd, Cu, Pb y Zn) en cuatro macrófitas arraigadas. Deng et al. (2004) demostraron la eficiencia de acumulación y tolerancia a diferentes metales (Pb, Zn, Cu y Cd) de 12 especies arraigadas.

Typha domingensis es una especie de rápido crecimiento y elevada biomasa y, por lo tanto, posee una elevada capacidad competitiva frente a otras especies emergentes. Keddy et al. (1994), estudiaron la habilidad competitiva de 20 especies vegetales de humedales naturales. Sus resultados indicaron que las especies con mayor capacidad competitiva fueron las rizomatosas perennes con elevada biomasa individual debido a su gran capacidad para almacenar nutrientes. En otros trabajos de competencia, *T. angustifolia* fue una de las especies preponderantes debido a su capacidad para dominar sitios con densa vegetación (Weiher y Keddy, 1995; Bernard, 1999), a la vez que *T. latifolia* se encontró dentro de la jerarquía competitiva más alta (Gaudet y Keddy, 1995). Por esta razón, las especies de *Typha* sp. son mundialmente estudiadas a escala de laboratorio, invernadero y en humedales construidos para el tratamiento de diversos efluentes.

A escala de laboratorio, Manios et al. (2003) realizaron una experiencia con *T. latifolia* a fin de evaluar los efectos de la acumulación de varios metales. Estos autores encontraron una reducción de clorofila de 1081 a 715 $\mu\text{g g peso fresco}^{-1}$ en las plantas expuestas a irrigación con una solución de Cd, Cu, Ni, Pb y Zn de 4, 80, 40, 40 y 80 mg L^{-1} , respectivamente. Chandra y Yadav (2010) evaluaron la potencialidad de *Typha angustifolia* para ser utilizada en la fitoremediación de Cu, Pb, Ni, Fe, Mn y Zn en presencia de fenol y melanoidina observando una tolerancia a las condiciones experimentales. Yadav y Chandra (2010) observaron que *T. angustifolia* fue más tolerante a la exposición de Fe, Cr, Pb, Cu y Cd que la especie *Cyperus esculentus* L. Macek y Rejmánková (2007) encontraron que el crecimiento vertical y horizontal de plantas de *T. domingensis* fue limitada por la alta salinidad. Glenn et al. (1995) observaron que a una concentración de 9 ppt de NaCl, la altura y el número de nuevos tallos de *T. domingensis* presentaron un decrecimiento significativo.

Además de estudios referidos a la tolerancia de macrófitas (teniendo en cuenta el crecimiento y la síntesis de clorofila), se han realizados trabajos que estudiaron los efectos de los contaminantes sobre la morfología de raíces. Por ejemplo, White y Ganf (2001) encontraron un mayor desarrollo de las raíces de plantas de *T. domingensis* que crecieron en

medios con agregado de nutrientes. Kapitonova (2002) estudió las variaciones en la estructura anatómica de órganos vegetativos de diferentes macrófitas bajo condiciones de aguas contaminadas por efluentes industriales. Nilratnisakorn et al. (2007) observaron que la tasa de crecimiento de *T. angustifolia* fue afectada por efluentes con alta salinidad y pH provenientes de una fábrica de tinturas sintéticas. Estos autores observaron en imágenes de microscopio electrónico de barrido que las raíces fueron dañadas después de ser sometidas al tratamiento del efluente y que el Na se depositó en las células de las raíces y hojas produciendo una inhibición de la fotosíntesis debido a la obstrucción del transporte de solutos.

Utilización de humedales construidos para el tratamiento de efluentes

La tecnología de wetlands construidos es una de las formas de tratamiento de efluentes cada vez más difundidas en los últimos años debido a su alta eficiencia y bajo costo (Kadlec y Wallace, 2009). Los wetlands naturales se han utilizado como receptores de aguas residuales desde la antigüedad. Los chinos y los egipcios los utilizaban desde tiempos remotos. El siglo XX trajo el desarrollo de sistemas de wetlands construidos por el hombre, diseñados para enfatizar características específicas de los humedales naturales, con el objeto de mejorar la eficiencia del sistema.

Los wetlands construidos pueden clasificarse en:

- Los wetlands de flujo de agua libre o de agua superficial (FWS según su sigla en inglés) presentan áreas de agua a cielo abierto y son de aspecto similar a los pantanos naturales. Debido a su capacidad de enfrentar pulsos de flujo y niveles de agua variables, pueden utilizarse para tratamiento final de aguas residuales proveniente de procesos de tratamiento secundario o terciario de aguas pluviales urbanas, de la agricultura y de la industria, para el tratamiento de aguas de minas, pulido final de efluentes con metales pesados y tratamientos de lixiviación. Depuran mediante los procesos de filtración, oxidación, reducción, sedimentación, precipitación y adsorción al sedimento y absorción por las plantas.
- Los wetlands de flujo subsuperficial horizontal (HSSF según su sigla en inglés), que normalmente utilizan un lecho de grava sembrada con plantas enraizadas. El

agua, que se mantiene por debajo de la superficie de la lecho, fluye horizontalmente desde la entrada hasta la salida, interactuando con el sistema rizosférico. Comúnmente se utilizan para tratamiento secundario para viviendas unifamiliares, pequeños grupos de viviendas, para comunidades pequeñas y para efluentes agroindustriales.

- Los wetlands de flujo vertical (VF según su sigla en inglés) distribuye el agua a través de la superficie de un lecho de arena o grava sembrada con plantas acuáticas enraizadas wetlands. El agua se filtra a través de la zona de la raíz de las plantas. Se utilizan para efluentes cloacales, municipales, y de la industria alimenticia, donde el objetivo de diseño es producir un efluente nitrificado.

En Europa se tiene reportes de disposición a terrenos que datan de los comienzos del Renacimiento. En algunos países del sudeste asiático, el cultivo de plantas acuáticas en lagunas es usado tradicionalmente para depurar aguas contaminadas y recuperar así nutrientes de las mismas (Abbasi, 1987). En dichas culturas y desde hace siglos, los granjeros han convertido el reciclado de nutrientes en un arte. Ya en el año 1950 había en Malasia granjas funcionando con esta base. Desafortunadamente es poca la información disponible acerca de su diseño y eficiencia. Sin embargo, se piensa que el primer "wetland artificial" se construyó en Australia en 1904. Los primeros trabajos con plantas fueron reportados en 1950 por la Dra. Saidel en Alemania. El primer wetland construido de flujo de agua libre comenzó a funcionar en Holanda en 1960 y el primer wetland sub-superficial en 1970. En América los estudios comenzaron en la década de 1970. La primera conferencia internacional sobre control biológico de aguas residuales, fue en la Universidad de Pensylvania en 1976. Allí fueron establecidos los primeros conceptos en el uso de plantas acuáticas para el tratamiento de aguas residuales. Se presentaron entonces los primeros trabajos realizados con *E. crassipes* en los Laboratorios Nacionales de Tecnología Espacial (National Space Technology Laboratories, NSTL) de la NASA (Wolverton, 1987). El rápido desarrollo de esta tecnología llevó a la realización de la conferencia en sistemas acuáticos para el tratamiento de aguas residuales en la Universidad de Davis, California, en septiembre de 1979. Fue allí que se introdujeron propiamente los sistemas acuáticos al mundo de la ingeniería como una nueva herramienta para el tratamiento de las aguas de desecho.

Una de las plantas que ha sido más ampliamente estudiada es *E. crassipes*. El primer sistema operativo de tratamiento de aguas residuales domésticas con esta especie fue instalado en los NSTL en 1976. El primer sistema operativo para el tratamiento de aguas

residuales de laboratorios fotográficos y químicos fue en 1975, también en los NSTL. Este último funcionó muy bien por 11 años y luego fue extendido con un filtro rocoso con plantas arraigadas (*Phragmites communis* Trin. y *Typha latifolia* L.). En 1978, en Coral Springs, Florida, se instaló para el Coral Springs Improvement District un sistema terciario para tratar el efluente de una planta de lodos activados, obteniéndose una concentración final de N y P del orden de 3 y 1 mg L⁻¹, respectivamente. En 1979, un proyecto conjunto entre los NSTL, la Environmental Protection Agency (EPA) y el Coral Springs Improvement District, dio lugar a una planta de tratamiento para aguas domésticas de Disney World en Orlando, Florida. Posteriormente, se instaló un reactor anaerobio que produce metano a partir de la biomasa cosechada en el sistema. Así, con la obtención de energía, se cerró el proceso combinando el tratamiento del agua residual con la recuperación de energía. El sistema más ambicioso que se tenga noticia es el implantado en San Diego, California. Fue instalado en 1984 para la obtención de agua potable a partir de aguas residuales urbanas. El eje del tratamiento eran lagunas con *E. crassipes*.

Una desventaja de plantas como *E. crassipes* y otras similares es su escasa resistencia a las bajas temperaturas. En la búsqueda de extender el rango de temperatura para la operación de estos sistemas, se comenzó a trabajar con plantas más tolerantes como lo son las especies arraigadas, entre ellas, *Scirpus californicus* (Mey.) Steud., planta que comenzó a estudiarse en 1976 en Alemania. En los NSTL se instaló un humedal artificial con esta misma planta, para el mejoramiento del efluente de lagunas facultativas. También, existe un sistema similar en Collins, Mississippi, y se ha estudiado un sistema piloto de este tipo por años en Arcata, California. Los sistemas con plantas sin cosechar han dado resultados de hasta 50% de remoción de DBO₅ con un tiempo de residencia hidráulico de 6-7 días. En general, los resultados son muy optimistas para el uso de estos sistemas en climas templados. Además, pueden mencionarse los sistemas combinados de plantas emergentes y filtros biológicos. El cultivo de plantas arraigadas en un lecho de rocas provoca una extensión de la capacidad de los sistemas con plantas solas y el tradicional filtro percolador por separado. La relación simbiótica entre microorganismos y plantas hace que estos sistemas superen en muchos casos la capacidad del filtro percolador tradicional, conocido desde 1892.

La utilización de humedales construidos ha experimentado un desarrollo tecnológico importante que los lleva a ubicarse actualmente como una alternativa competitiva a la hora de la selección de un método de tratamiento de residuos líquidos. Si bien al principio se aplicaron más bien en etapas terciarias de depuración, actualmente está comprobada su utilidad en todos los niveles de tratamiento, sustituyendo en muchos casos con ventaja los

tratamientos convencionales (Kadlec y Wallace, 2009). Hay experiencias muy positivas tanto para efluentes domésticos como industriales.

La mayoría de los trabajos y de las investigaciones sobre humedales, como ya dijimos, han sido realizadas para la depuración de efluentes domiciliarios y agrícolas, donde los contaminantes a eliminar fueron P y N (Athie y Cerri, 1987; Sedlack, 1991; Weisner et al., 1994; Adler et al., 1996; Perdomo et al., 2000; Saunders y Kalff, 2001; Ansola et al., 2003). Los resultados informados indican remociones en el rango de 30-98% de parámetros como P, nitrógeno total Kjeldahl (NTK), amonio y nitrato. Los estudios realizados en humedales construidos muestran que los porcentajes de remoción de parámetros como DBO y demanda química de oxígeno (DQO) son generalmente altos mientras que los porcentajes de remoción de nutrientes (N y P) son frecuentemente inferiores y más variables (Song et al., 2006). Gersberg et al. (1986) encontraron una remoción aproximada del 30% de amonio utilizando *T. latifolia* y del 90% utilizando *Scirpus validus* Vahl. en humedales monoespecíficos construidos en California para el tratamiento de efluentes domiciliarios. Bishop y Eighmy (1989) informaron una remoción del 47% para el NTK, 75% para el amonio y 38% para el P en un humedal construido para el tratamiento de efluentes domiciliarios en New Hampshire, Estados Unidos. En un humedal construido para el tratamiento de residuos domiciliarios próximo a Oslo, Noruega, Jenssen et al. (1993) encontraron una remoción del 55% para el NTK y del 98% para el P. Dicho humedal estuvo constituido por tres subsistemas. El primero consistió en un filtro de arena, el segundo en una unidad de desnitrificación de sustrato arenoso y el tercero, en una unidad de remoción de P que contenía un sustrato reactivo poroso denominado comercialmente LECA. Los dos últimos subsistemas fueron plantados con *Phragmites australis* (Cav.) Steud. y *T. latifolia*. En Massachusetts, Estados Unidos, Peterson y Teal (1996) realizaron un tratamiento de efluentes domiciliarios en un sistema artificial dividido en dos etapas. En la primera, se utilizó *E. crassipes* encontrando una remoción del 68% del N total. La segunda consistió en un sistema con diversas macrófitas reteniéndose el 38% del N total. Merlin et al. (2002) estudiaron un humedal artificial de flujo sub-superficial, ubicado a una elevación de 720 metros en montañas prealpinas de Francia. El proceso de tratamiento consistió en un sistema de tres etapas dimensionado para el tratamiento de un efluente cloacal con un caudal equivalente al de una comunidad de 350 personas. El tiempo de residencia hidráulica fue de 4-5 días. Las especies utilizadas fueron *T. latifolia*, *P. australis* y *Scirpus maritimus*. En promedio, la retención de P fue de 90%, confirmando que este tipo de sistema podría ser considerado como una alternativa de tratamiento de efluentes cloacales en pequeñas

comunidades, incluso en áreas montañosas. Mariñelarena et al. (2005) registraron una eficiencia de remoción de DQO de 24% y 34% a tiempos de residencia hidráulica de 0,9 y 0,4 días, respectivamente, en un humedal experimental de flujo subsuperficial de 60 m² que utilizó a *S. californicus* y *Typha* sp. para el tratamiento de los efluentes de la destilería de la empresa Repsol YPF en La Plata.

Con respecto a la remoción de contaminantes metálicos utilizando humedales, Ellis et al. (1994), estudiaron la acumulación de Cd, Zn, Cu y Pb en tejidos de *T. latifolia* y *Juncus effusus* L. en un humedal natural de Londres que recibía desagües pluviales, actuando estas especies como una efectiva barrera de filtración. Beining y Otte (1997) encontraron que las concentraciones de Zn, As, Pb y Cd disminuyeron en un efluente de escorrentía de una mina al atravesar un humedal natural en Irlanda. Para el Zn la retención fue del 95% y para el As del 65%. Vesik y Allaway (1997) informaron que las concentraciones de Cu y Pb en tejidos de *E. crassipes* disminuyeron exponencialmente con el incremento de la distancia a la descarga del efluente en un humedal construido en Sydney, Australia. En un estudio de un humedal construido para el control de las aguas de escorrentía de una autopista en Berkshire, Inglaterra, se propone que un efectivo modelo de tratamiento de este tipo de escorrentía mediante humedales construidos se logrará sólo si los humedales retienen los metales en los sedimentos (Pontier et al., 2004).

Vymazal (2011) realizó una revisión pormenorizada de la experiencia mundial acumulada durante las últimas 5 décadas referida a la utilización de humedales construidos para el tratamiento de efluentes. Este autor destacó que en la actualidad estos sistemas son reconocidos como tecnologías confiables para tratar efluentes industriales y representan una solución adecuada para el tratamiento de muchos efluentes con distintas características.

En nuestro país, el humedal construido para el tratamiento de efluentes con metales que posee la mayor antigüedad de operación fue estudiado por el grupo de trabajo del cual la tesis forma parte (Maine et al., 2006; Maine et al., 2007; Maine et al., 2009; Hadad et al., 2010; Di Luca et al., 2011). Dicho humedal fue construido en la ciudad de Santo Tomé, Santa Fe (Argentina), en una industria metalúrgica. Se construyó para tratar sus efluentes, los cuales presentan alto pH y conductividad y contienen Cr, Ni, Zn (efluente industrial), P y N (efluente cloacal). En el humedal se transplantaron varias especies de macrófitas. *Eichhornia crassipes* llegó a ser la especie dominante durante el primer año de estudio pero su cobertura disminuyó durante seis meses hasta desaparecer. Luego, la especie emergente *Typha domingensis* se convirtió en la dominante. El wetland demostró ser muy eficiente en la retención de contaminantes durante la dominancia de esta especie. El crecimiento de las

plantas en el wetland definitivo presentaron el mismo patrón de crecimiento que en el wetland a escala piloto, predominando las flotantes en una primera etapa, para luego disminuir su cobertura a medida que *T. domingensis* se convertía en la dominante y mantenía su cobertura, mostrando excelente capacidad de adaptación a las condiciones del efluente y buenas eficiencias de retención de contaminantes. Por este motivo planteamos en esta tesis estudiar su tolerancia y la eficiencia en la retención de contaminantes y nutrientes. Los resultados de este trabajo serán una importante herramienta a la hora de la toma de decisiones en el manejo y operación de wetland construidos.

Para desarrollar el trabajo se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos:

VI. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

VI.I. Hipótesis:

- 1) *T. domingensis* será tolerante a altos valores de pH y conductividad y a la presencia de Cr, Ni y Zn.
- 2) La presencia de P y N favorecerá la tolerancia y capacidad de sorción de metales pesados por parte de las plantas.
- 3) Altos valores de pH y de conductividad afectarán la tolerancia y capacidad de sorción de metales pesados, P y N de *T. domingensis*.
- 4) Las plantas de *T. domingensis* provenientes del humedal construido serán más tolerantes a las condiciones del efluente que las plantas provenientes de un ambiente natural.
- 5) La velocidad de sorción y de transporte en la planta será diferente entre los metales y el P.
- 6) Las características morfológicas de plantas de *T. domingensis* desarrolladas en el humedal construido serán diferentes que las desarrolladas en humedales naturales.
- 7) La biomasa seca de *T. domingensis* será eficiente en la sorción de metales.

VI.II. Objetivos:

VI.II.I. Objetivo General:

Estudiar la tolerancia y la eficiencia en la retención de metales y nutrientes de la macrófita arraigada *T. domingensis* bajo condiciones que simulan un humedal construido para tratamiento de efluentes industriales con alto pH, conductividad y metales pesados.

VI.II.II. Objetivos específicos:

- Estudiar la tolerancia de *T. domingensis* a elevada alcalinidad y salinidad.
- Evaluar la tolerancia y la capacidad de sorción de Cr, Ni y Zn de *T. domingensis*.
- Evaluar si la presencia de nutrientes (N y P) afecta la tolerancia y capacidad de sorción de Cr, Ni y Zn.
- Evaluar si el pH y la salinidad afectan la tolerancia y capacidad de sorción de metales pesados, P y N de *T. domingensis*.
- Estudiar la dinámica del P, Cr, Ni y Zn en el sistema agua-sedimento-*T. domingensis*.
- Evaluar si plantas de *T. domingensis* que crecen en un humedal construido para tratamiento de efluentes son más tolerantes a metales pesados, pH y conductividad que plantas de la misma especie desarrolladas en un humedal natural.
- Comparar las características morfológicas de plantas de *T. domingensis* que crecen en el humedal construido para tratamiento de efluentes y plantas de la misma especie que se desarrollan en humedales naturales con diferentes calidades de agua.
- Evaluar la eficiencia de remoción de metales de la biomasa seca de *T. domingensis*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS:

VII.I. Experiencias de Invernadero

Se realizaron experiencias de invernadero para determinar las respuestas de *T. domingensis* a la salinidad, pH, metales (Cr, Ni y Zn) y nutrientes (P y N) y estimar su eficiencia de acumulación.

El invernadero en el cual se realizaron las experiencias, posee techo de fibra de vidrio translúcida, paredes móviles de media sombra blanca, piso blanco, con temperatura y fotoperíodo natural.

Para realizar los experimentos, se recolectaron plantas en buenas condiciones y con similar estado de crecimiento y color de hojas. Después de su recolección, se lavaron y se trasladaron al invernadero para su aclimatación durante 15 días bajo fotoperíodo natural, luego se plantaron en acuarios plásticos de 10 L de capacidad, ya que se ha demostrado que es el material que posee menor capacidad de adsorción de metales (Prakash et al., 1987). La Fig. VII.1 muestra una vista parcial del invernadero y de los acuarios utilizados.

En los experimentos los acuarios fueron dispuestos por triplicado. Durante todas las experiencias, las plantas se desarrollaron bajo fotoperíodo natural y la temperatura ambiente del invernadero osciló entre 15 y 35°C. Todas las experiencias se realizaron durante la primavera y verano.

Los objetivos y el diseño de cada experiencia se detallarán en los sucesivos capítulos.



Fig. VII.1. Vista de los acuarios utilizados en la realización de los experimentos de invernadero.

VII.I.I. Descripción botánica de la especie estudiada:

Typha domingensis Pers. es una monocotiledónea perteneciente a la Familia Typhaceae. Su nombre vulgar es “Totorá”. Es una hierba perenne, rizomatosa, de 1-2,5 m de alto. Posee hojas con láminas lineares, acintadas, de 40-120 cm de largo por 0,5-2 cm de ancho, con la cara superior plana y la inferior ligeramente convexa. Sus flores son unisexuales, muy pequeñas, dispuestas en espigas densas. Las flores estaminadas se ubican en la región superior de la espiga, mientras que las flores postiladas se encuentran en la parte basal. El fruto es fusiforme de 1-1,5 mm de largo. Florece en primavera.

Es una especie de amplia distribución mundial. En Argentina se encuentra en casi todo el país. Habita en sitios bajos, inundables, zanjas, cunetas, bordes de esteros, lagunas y cursos de agua. En general se encuentran formando “totorales” (Dimitri, 1977).

Esta especie es ampliamente estudiada en humedales naturales y construidos para el tratamiento de diversos efluentes debido a su elevada resistencia a los contaminantes (Fediuc et al., 2005; Maine et al., 2009; Hegazy et al., 2011; Dordio et al., 2011).

VII.I.II. Estudios a campo

Se utilizaron como sitios de estudio y de muestreo de plantas, agua y sedimento para experiencias en invernadero, un humedal construido y humedales naturales no contaminados de la zona. En los capítulos sucesivos se explica los objetivos y metodología específica utilizada en cada estudio de campo.

VII.I.III. Humedal construido

El humedal estudiado pertenece a la empresa metalúrgica SNA-E (ex Bahco Argentina S. A.), está ubicado en su planta industrial de Santo Tomé, Santa Fe (31° 40' 66" S; 60° 47' 80" O) (Fig. VII.2). El humedal estudiado es de flujo superficial. Como la relación longitud:ancho del humedal afecta directamente la distribución del flujo y la hidráulica del sistema, los valores mínimos recomendados son 2:1 (Tchobanoglous y Burton, 1996). Debido a que sus dimensiones son de 50 m de largo por 40 m de ancho, se construyó un tabique central, paralelo al sentido de circulación del efluente, el cual dividió al humedal en dos secciones de igual superficie, aumentando el recorrido para lograr una relación 5:1 (Fig. VII.3). El efluente abandona el humedal a través de una compuerta. Dicho efluente,

después de atravesar y abandonar el humedal, es conducido por una tubería hacia una laguna de 1 ha que existe en el mismo predio. El humedal tiene una profundidad de aproximadamente 40-70 cm, con un tiempo de residencia hidráulica estimado entre 7-12 días.

Como medida de seguridad, el humedal se impermeabilizó con 5 capas compactadas de bentonita alcanzando una profundidad total aproximada de 60 cm con una conductividad hidráulica de 10^{-7} m s^{-1} . Sobre la misma se colocó 1 m de suelo proveniente de la excavación donde se arraigaron las plantas. Se transplantaron diferentes especies de macrófitas representativas de la diversidad vegetal regional para permitir que la competencia en un ambiente de condiciones extremas definiera la composición final de la vegetación. Durante el período que abarca el presente estudio, la especie que dominó en el humedal construido fue *T. domingensis*. Los resultados que se informan incluyen un período de 4 años comprendidos entre abril de 2007 hasta abril de 2011.



Fig. VII.2. Foto aérea del humedal construido en la planta metalúrgica SNA-E.

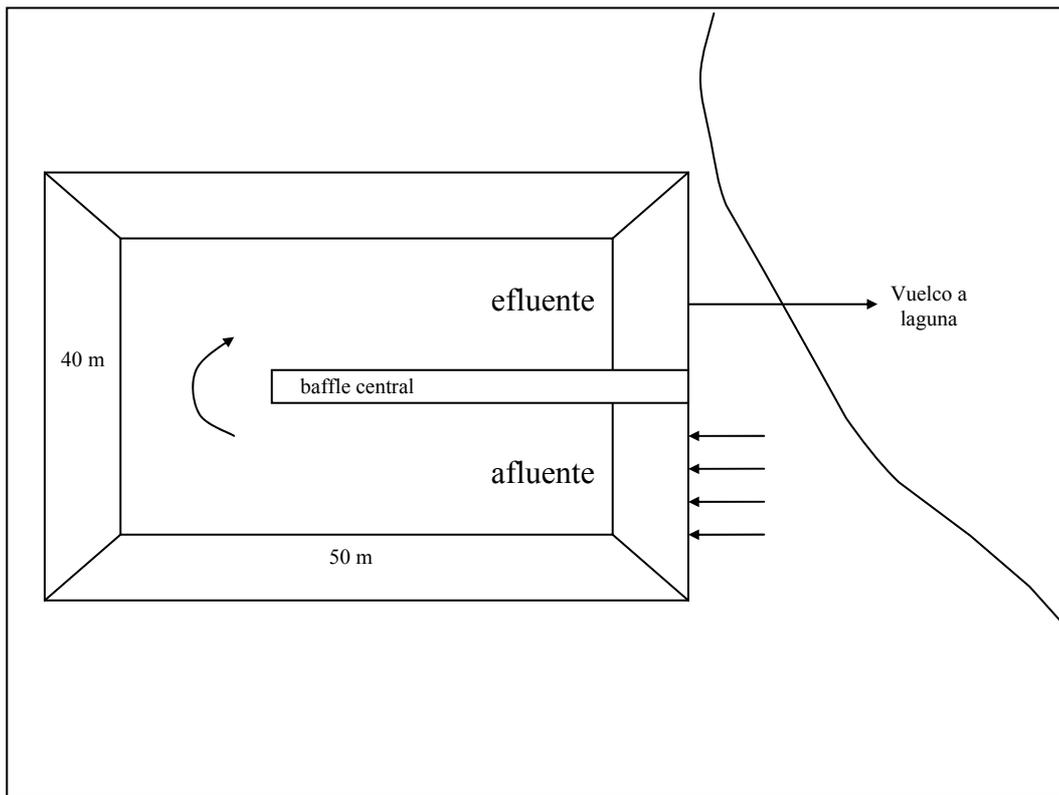


Fig. VII.3. Esquema de la vista superior del humedal definitivo.

Humedales naturales

Debido a prolongadas sequías e inundaciones que ocurrieron en los humedales naturales, para realizar las experiencias de invernadero se debió cambiar los sitios de extracción de plantas. Es por esto que las plantas se muestrearon en tres sitios naturales diferentes, pero todos pertenecientes a la llanura de inundación del río Paraná Medio.

El sitio 1 es un humedal periurbano que pertenece a la ciudad de Santa Fe (S 31° 38'41", O 60° 39' 51") (Fig. VII.4).

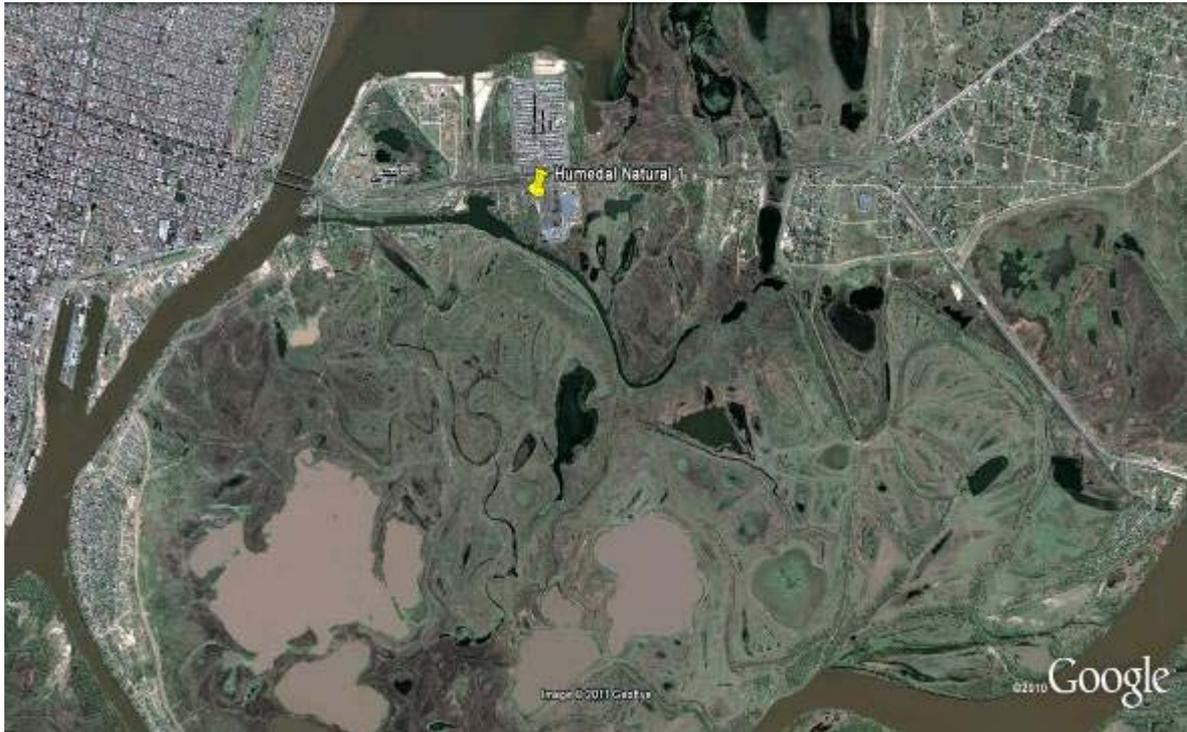


Fig. VII.4. Foto satelital del humedal natural **Sitio1** (extraída de Google Hearth).



Fig. VII.5. Foto satelital del humedal natural **Sitio 2** (extraída de Google Hearth).

El sitio 2 es una laguna que se encuentra próxima a la localidad de Arroyo Leyes, Provincia de Santa Fe (31° 32' 45" S; 60° 29' 37" O) (Fig. VII.5). En este sitio se realizó un seguimiento del crecimiento de *T. domingensis* así como también de las concentraciones de nutrientes y metales en agua, sedimento y tejidos vegetales paralelamente al monitoreo efectuado en el humedal construido. En la Fig. VII.6 se muestra el ambiente natural poblado por *T. domingensis*.



Fig. VII.6. Plantas de *T. domingensis* en el humedal natural donde se realizó el seguimiento de la vegetación paralelamente al estudio del humedal construido.

El sitio 3 es humedal periurbano que se encuentra en la localidad de Rincón, Provincia de Santa Fe (31° 36' 18,46" S; 60° 33' 50,04" O) (Fig. VII.7).

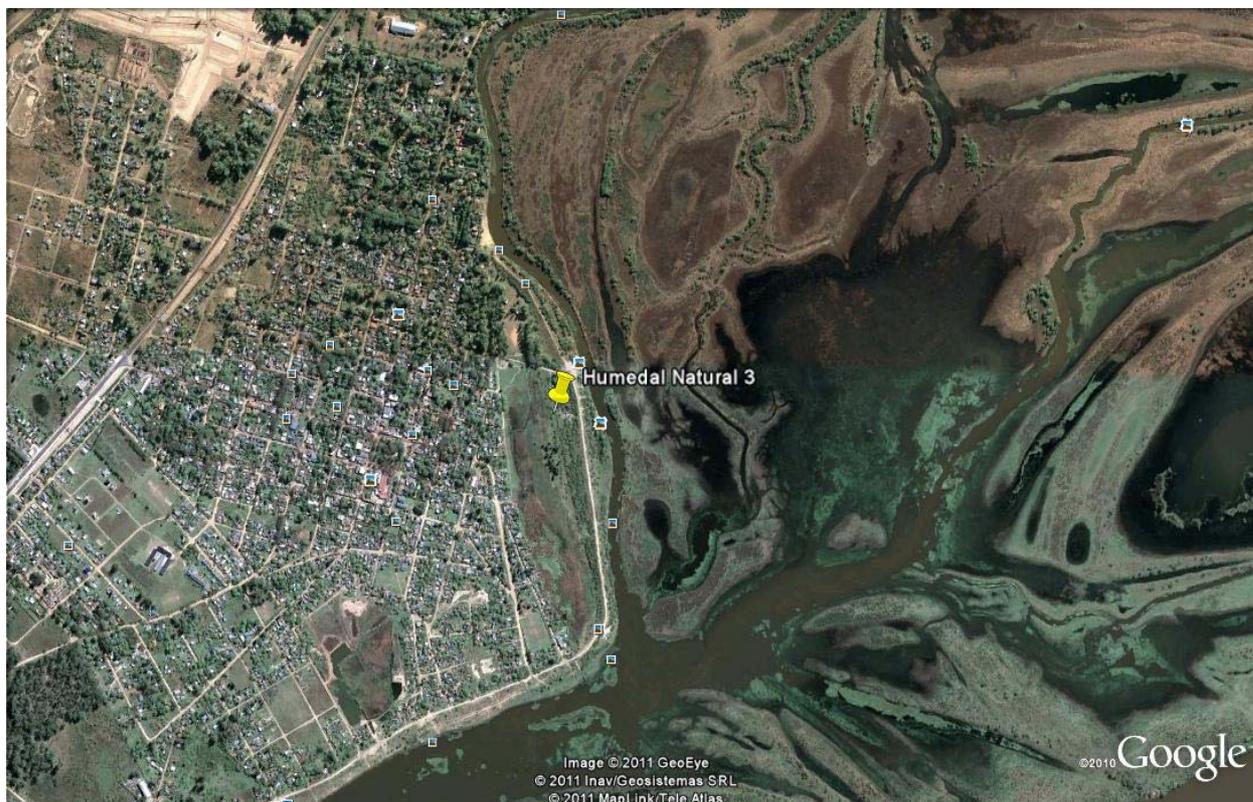


Fig. VII.7. Foto satelital del humedal natural **Sitio 3** (extraída de Google Earth).

VII. IV. Determinaciones analíticas

VII.IV.I. Determinación de parámetros fisicoquímicos en agua:

Las determinaciones fueron realizadas por miembros del equipo de investigación del Laboratorio de Química Analítica de la facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral.

Las determinaciones analíticas en agua se llevaron a cabo utilizando técnicas normalizadas de APHA (1998). Las técnicas empleadas para determinar cada parámetro se detallan a continuación:

- **Conductividad, OD y pH:**

La conductividad del agua se midió con un conductímetro portátil marca YSI modelo 33. El OD (oxígeno disuelto) se midió con un oxímetro Horiba OM-14 y el pH con un peachímetro Orion.

- **Sólidos totales disueltos:**

Evaporación de 50 ml de agua en cápsula de porcelana y secado en estufa a 105°C hasta pesada constante.

- **Sulfato (SO_4^{2-}):**

Método turbidimétrico: En medio ácido se precipita el sulfato con cloruro de bario. Se mide la absorbancia de luz de la suspensión formada en espectrofotómetro a 420 nm y se determina la concentración de sulfato por comparación con curva de calibrado.

- **Cloruro (Cl):**

Por titulometría por precipitación con nitrato de plata (Método de Mohr), utilizando dicromato de potasio como indicador.

- **Carbonato-Bicarbonato ($CaCO_3$):**

Por volumetría ácido-base con hidróxido de sodio, usando fenolftaleína y verde de bromo cresol como indicadores.

- **Dureza total:**

Volumetría quelatómetrica con EDTA trabajando a pH=10 y usando NET como indicador.

- **Calcio (Ca):**

Volumetría quelatómetrica con EDTA trabajando a pH=12 (llevado con NaOH) y utilizando murexida como indicador.

- **Magnesio (Mg):**

Método de cálculo: Se determina la concentración de Mg por diferencia entre la dureza total y el Ca.

- **Sodio y Potasio (Na y K):**

Por fotometría de emisión de llama. Se utilizó un fotómetro marca Metrolab modelo 315.

- **Nitrito (NO_2^-):**

Determinación mediante método colorimétrico basado en la diazotación de ácido sulfanílico con el nitrito presente en la muestra y posterior copulación del compuesto formado, con N-(1 naftil) etilendiamida de hidrocloreto, obteniéndose un compuesto rosado que se lee con un espectrofotómetro a 543 nm. Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20.

- **Nitrato (NO_3^-):**

Medición Potenciométrica con electrodo selectivo (Potenciómetro y Electrodo Orion, sensibilidad $0,01 \text{ mg L}^{-1} NO_3^-$, reproducibilidad $\pm 2\%$), utilizando método de adición estándar.

- **Amonio (NH_4^+):**

Nesslerización directa, previa precipitación de interferencia utilizando tartrato de sodio y potasio. El color amarillo desarrollado se mide a 425 nm. Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20.

- **Fósforo Reactivo Soluble (PRS):**

La técnica utilizada fue la propuesta por Murphy y Riley (1962) para determinación de ortofosfatos solubles, utilizando molibdato de amonio y tartrato de antimonil potasio, que reaccionan en medio ácido con el ortofosfato para formar ácido fosfomolibdico, el cual es reducido por el ácido ascórbico a azul de molibdeno. El color azul desarrollado se lee con un espectrofotómetro a 880 nm. Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20.

- **Fósforo Total (PT):**

Digestión de la muestra con ácido nítrico y ácido sulfúrico, neutralización y determinación de fosfato por el método de Murphy y Riley (1962) detallado anteriormente.

- **Demanda Química de Oxígeno (DOO):**

Se determinó por el método de reflujó abierto.

- **Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO):**

Se determinó por el test de 5 días.

- **Hierro, Cromo, Níquel y Zinc (Fe, Cr, Ni, Zn):**

Se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica (por llama o atomización electrotérmica, según la concentración de la muestra, Perkin Elmer 5000), siguiendo los métodos preconizados por APHA (1998).

Observaciones:

Las muestras de agua se mantuvieron refrigeradas hasta su análisis. Las determinaciones de los parámetros químicos en agua se realizaron sobre muestras previamente filtradas con filtros de 0,45 μ marca Millipore y conforme a APHA (1998). Las determinaciones de fosfato, nitrato, nitrito y amonio se realizaron dentro de las primeras 24 horas de tomada la muestra. El espectrofotómetro utilizado en las determinaciones colorimétricas fue un Metrolab 325 BD UV Visible, con cubetas de 1 y 10 cm de paso óptico.

VII.IV.II. Determinación de parámetros químicos en sedimento y vegetales:

- **Fósforo Total (PT):**

Para la determinación de PT en sedimentos y vegetales se realizó una digestión con mezcla ácida de $\text{HClO}_4:\text{HNO}_3:\text{HCl}$ (5:3:2). Las soluciones obtenidas se neutralizaron con $\text{Na}(\text{OH})$ 10 M y se llevaron a volumen. Las determinaciones de PRS se realizaron por la técnica colorimétrica de azul de molibdeno (Murphy y Riley, 1962).

- **Nitrógeno Total Kjeldahl (NTK):**

El NTK en sedimentos y vegetales se determinó por el método Macro-Kjeldahl de acuerdo a la APHA (1998). Se realizó una digestión con ácido sulfúrico y sales catalizadoras. De esta manera, el nitrógeno orgánico se transforma a amonio. Se determina el amonio (original más el proveniente del nitrógeno orgánico) mediante el uso de electrodo de ion selectivo amonio Orion (sensibilidad $0,01 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$, reproducibilidad $\pm 2\%$).

- **Cromo, Níquel y Zinc (Cr, Ni, Zn):**

Las determinaciones de Cr, Ni y Zn en sedimentos y vegetales se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica con llama o con horno de grafito (Instrumento: Perkin Elmer AAnalyst 300 o por Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-AES) marca Shimadzu, modelo 1000 III), previa digestión con mezcla ácida de $\text{HClO}_4:\text{HNO}_3:\text{HCl}$ (5:3:2) y calentamiento hasta aparición de humos blancos de perclórico.

Se utilizó Espectroscopía de Emisión Atómica por Plasma Acoplado Inductivamente, ya que permite, el análisis multielemental alcanzando menores límites de detección. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Análisis Químicos (LANAQUI), del Departamento de Agronomía perteneciente a la Universidad Nacional del Sur (CERZOS-CONICET-UNS).

Observaciones:

Las digestiones se realizaron sobre muestras de vegetales y sedimentos secadas en estufa durante 48 horas a 70°C . En los vegetales las determinaciones se realizaron en hojas, raíces y rizomas. Tanto en muestras de sedimento como de vegetales las concentraciones se refirieron a peso seco (105°C).

VII.V. Estudio de la vegetación:

En todos los experimentos y durante el estudio el humedal construido y del natural se midió el peso seco de las partes aéreas (hojas) y subterráneas (raíces y tallos), se calcularon las tasas de crecimiento relativo, se determinaron las concentraciones de clorofila *a* y se estudió la morfología interna de raíces.

VII.V.I. Biomasa y crecimiento:

Para determinar la biomasa en las experiencias de invernadero, las plantas utilizadas se separaron en sus partes aéreas (hojas) y subterráneas (rizomas y raíces), colocándolas en estufa a 105° C hasta peso constante (Westlake, 1974; APHA, 1998).

Además, Se calcularon las tasas de crecimiento relativo en base a la altura de plantas, según la ecuación (1), propuesta por Hunt (1978):

$$R = \frac{\ln H_2 - \ln H_1}{T_2 - T_1} \quad (1)$$

donde R = tasa de crecimiento relativo ($\text{cm cm}^{-1} \text{ día}^{-1}$), H_1 y H_2 = Altura inicial y final, respectivamente, y $T_2 - T_1$ = tiempo de experimentación.

Para estimar biomasa en el humedal construido y en los naturales, se recolectaron mensualmente muestras de vegetación con un marco cuadrado de 50 cm de lado, arrojando dicho marco cuatro veces al azar dentro del humedal. Se cosecharon manualmente todas las plantas halladas en su interior siguiendo la metodología propuesta por Westlake (1974) y APHA (1998). En laboratorio, las plantas recolectadas se lavaron y se separaron en sus partes aéreas (tallos y hojas) y sumergidas (rizomas y raíces colocándolas en estufa a 105° C hasta peso constante (Westlake, 1974; APHA, 1998). En el humedal construido se determinó mensualmente la cobertura midiendo la superficie que ocupó *T. domingensis* dentro del humedal a fin de obtener un porcentaje en función de la superficie total de humedal.

VII.V.II. Concentración de Clorofila:

Se determinaron las concentraciones de clorofila *a* al inicio y al final de los experimentos y periódicamente en los humedales construidos y naturales. Este pigmento se extrajo con acetona durante 48 h en condiciones de oscuridad y frío (3-5°C). Para calcular la concentración de clorofila *a*, los porcentajes de transmitancia de los extractos se leyeron a 645 y 665 nm usando un espectrofotómetro UV-Vis (Westlake, 1974).

VII.V.III. Estudio de la morfología interna:

Para la descripción de la morfología interna de raíces, se extrajeron segmentos cercanos a la base, de aproximadamente un centímetro de longitud, los cuales inmediatamente se fijaron en formol 4%. Transcurridas 48 hs, se traspasaron a etanol 70% para su conservación.

Con el material conservado se realizaron preparados histológicos. Las raíces principales se tomaron al azar y se cortaron transversalmente a mano alzada con hojas de afeitar nuevas siguiendo la técnica propuesta por D'Ambrogio de Argüeso (1986). Los cortes transversales de raíz se colorearon con azul de anilina (azul de algodón), que tiñe de azul las paredes celulósicas. Dichas secciones se examinaron en microscopio óptico Boeco modelo 101 a 100 y 400 aumentos totales. Con un ocular micrométrico, se midieron los diámetros de la raíz, de la médula y de los vasos metaxilemáticos. Para calcular los valores respectivos del área transversal de la raíz (ATR), del área transversal de la médula (ATM) y del área transversal de los vasos metaxilemáticos (ATV), se utilizó la fórmula para el cálculo del área de un círculo. Además, se contabilizó el número de vasos metaxilemáticos (NV) por sección.

VII.V.IV. Análisis de rayos X y microscopía electrónica de barrido (MEB):

Muestras de raíces y hojas fueron cortadas a 1 cm y secadas en estufa a 20°C durante 10 días con el fin de no dañar los tejidos (Suñé et al., 2007). Las muestras fueron examinadas con un microscopio electrónico de barrido; modelo JSM-35C, equipado con un sistema de energía dispersiva EDAX. Para el análisis químico elemental de los tejidos en hojas estas se dividieron en cara adaxial, abaxial y mesófilo. Las raíces fueron divididas en epidermis, parénquima cortical y médula. Porciones representativas de muestras fueron adheridas con cinta adhesiva de doble cara de grafito. Después de obtener los espectros y las imágenes digitales las muestras fueron adheridas con pintura de plata y luego cubiertas con oro usando un evaporador Veeco, modelo operador VE-300 en atmósfera de Argón.

VII.VI. Análisis estadístico

Se realizaron análisis de la Varianza de una y dos vías, según cada caso. En cada estudio se especifican los niveles de cada factor.

Se utilizó el test de Duncan para diferenciar medias cuando se detectaron diferencias significativas. Se utilizó un nivel de $p < 0,05$ en todas las comparaciones. La normalidad de los residuales se estudió gráficamente. Se utilizó el test de Bartlett para homocedasticidad, para corroborar si las variancias fueron homogéneas (Walpole et al., 1999; Pérez, 1998). La normalidad de los residuos fue analizados gráficamente y homogeneidad de variancias fue chequeado aplicando test de Barlett's. Debido a que los parámetros de la morfología interna de la raíz (ATR, ATM, ATV y número de vasos) no presentaron una distribución normal, se realizaron test no paramétricos y se realizaron gráficas de caja y bigote, utilizando la mediana como medida de tendencia central y el rango intercuartílico (25 y 75%) como medida de variabilidad. Se aplicó el análisis de Kruskal-Wallis para testear las diferencias entre los parámetros morfométricos medidos en las raíces. Cuando se presentaron diferencias estadísticamente significativas, el test de Wilcoxon se utilizó para comparar los tratamientos entre sí. En todas las comparaciones se utilizó un nivel de $p < 0,05$. Los cálculos se efectuaron utilizando el software Statgraphics Plus 3.0.

Capítulo 1

TOLERANCIA DE *Typha domingensis* Pers. A DISTINTAS CONDICIONES DE pH Y SALINIDAD

1.1. Introducción:

De acuerdo a lo observado en estudios previos de macrófitas flotantes realizados por el grupo de investigación de la Cátedra de Química analítica, tanto en el humedal construido y en laboratorio, se planteó realizar una experiencia preliminar sometiendo a plantas de *T. domingensis* a distintas condiciones de pH y salinidad (se eligieron las condiciones que se encuentran generalmente en humedales construidos para el tratamiento de efluentes industriales y en humedales naturales), para poder observar la tolerancia y los cambios morfológicos de esta especie. De acuerdo con los resultados de esta experiencia preliminar se determinaron los valores umbrales de tolerancia al pH y salinidad, que se utilizaron en un experimento posterior, donde se evaluó si plantas provenientes de un humedal construido y un humedal natural presentan la misma tolerancia a dichos parámetros. Se puede hipotetizar que *T. domingensis* va a tolerar las condiciones de altos pH y conductividad y se producirán cambios morfológicos como respuesta al estrés al cual fue sometida; debido a esto se observarán diferencias de adaptación en dos poblaciones de *T. domingensis* provenientes de dos sitios distintos (el humedal construido y un humedal natural).

1.2. Experiencia N° 1: Estudio preliminar de tolerancia al pH y salinidad

1.2.1. Objetivos:

- Estudiar la tolerancia y las modificaciones en la morfología de *T. domingensis* bajo distintas condiciones de pH y salinidad que simulan las de un humedal construido (para tratamiento de efluentes industriales con alto pH y salinidad) y las de un humedal natural.
- Determinar los valores umbrales de tolerancia de *T. domingensis* al pH y salinidad

1.2.2. Metodología

Recolección de las plantas y diseño experimental:

Se recolectaron plantas de *T. domingensis* de un ambiente natural (Sitio 1). Las plantas se encontraban saludables y poseían similar tamaño. Fueron podadas para evitar que se dañen durante el transporte hasta el invernadero. Luego, sus rizomas se plantaron en contenedores plásticos de 10 L de capacidad, en los que se colocó sedimento y se agregó

agua periódicamente. Los contenedores fueron colocados en invernadero para su aclimatación y crecimiento. Una vez que las plantas crecieron, se podaron hasta alcanzar una altura de 19 cm aproximadamente. La experiencia tuvo una duración de 30 días.

Se prepararon soluciones de distintos valores de pH y salinidad con agua del sitio de muestreo. Las salinidades fueron alcanzadas adicionando Sulfato de Sodio (Na_2SO_4). Esta sal fue elegida debido a que Na^+ y SO_4^{2-} son los iones mayoritarios tratados en el efluente del WC de una industria metalúrgica. Los valores de pH se mantuvieron utilizando soluciones buffer. Los valores de pH y salinidad estudiados fueron los que se encontraron en los distintos muestreos del humedal construido y de los humedales naturales de la zona. Las combinaciones de pH y conductividad estudiadas fueron las del siguiente esquema:

Salinidad/pH	pH= 7	pH= 8	pH= 9	pH= 10
200 mg L ⁻¹	X	X	X	X
4000 mg L ⁻¹	X	X	X	X
6000 mg L ⁻¹	X	X	X	X
8000 mg L ⁻¹	X	X	X	X

Determinaciones analíticas:

La caracterización fisicoquímica y química del agua y del sedimento del sitio de muestreo, se llevaron a cabo siguiendo las técnicas explicadas en la sección de materiales y métodos.

Estudio de la vegetación:

Periódicamente, se midió la altura de plantas y se calculó la tasa de crecimiento relativo de acuerdo a la ecuación que se explica en la sección de materiales y métodos. Se midieron las concentraciones de clorofila al inicio y al finalizar el experimento y de acuerdo a estos valores se calcularon los porcentajes de aumento de clorofila, según la técnica explicada en la sección de materiales y métodos.

Al finalizar la experiencia se realizaron cortes transversales de raíces que se examinaron en microscopio óptico. Se analizaron 30 secciones en aquellos contenedores con salinidad y pH extremos (200 mg L⁻¹ y pH 7; 200 mg L⁻¹ y pH 10; 8000 mg L⁻¹ y pH 7; 8000 mg L⁻¹ y pH 10) donde se midió el área transversal de las raíces (ATR), médula (ATM), número y área transversal de los vasos metaxilemáticos (NV y ATV, respectivamente).

Análisis Estadístico:

Se realizaron análisis de variancia de dos vías para determinar el efecto de la salinidad y el pH sobre la tasa de crecimiento de las plantas y la concentración de clorofila, luego se haber testeado la normalidad de residuos y homogeneidad de variancias. Debido a que los parámetros de la morfología interna de la raíz (ATR, ATM, ATV y número de vasos) no presentaron una distribución normal, se realizaron test no paramétricos. Se aplicó el análisis de Kruskal-Wallis para testear las diferencias entre los parámetros morfométricos medidos en las raíces. Cuando se presentaron diferencias estadísticamente significativas, el test de Wilcoxon se utilizó para comparar los tratamientos entre sí.

1.2.3. Resultados:

Las Tablas 1.1 y 1.2 muestran la caracterización fisicoquímica y química del agua y del sedimento del sitio de muestreo.

Tabla 1.1. Caracterización fisicoquímica y química del agua del Wetland natural (WN), Sitio 1 (ND=no detectado, LD=límite de detección).

Parámetros	WN
pH	7,71
Conductividad $\mu\text{mhos cm}^{-1}$	400
Alcalinidad (CaCO_3) (mg L^{-1})	261,2
Dureza Total (CaCO_3) (mg L^{-1})	121,7
Calcio (Ca) (mg L^{-1})	25,4
Magnesio (Mg) (mg L^{-1})	14,1
Hierro Total (Fe) (mg L^{-1})	0,51
Sulfato (SO_4^{2-}) (mg L^{-1})	8,9
Cloruro (Cl^-) (mg L^{-1})	7,1
Nitratos (NO_3^-) (mg L^{-1})	2,4
Nitritos (NO_2^-) (mg L^{-1})	ND (LD= 0,05)
Amonio (NH_4^+) (mg L^{-1})	0,54
PRS (mg L^{-1})	0,011
PT (mg L^{-1})	1,081
OD (mg L^{-1})	1,13

Tabla 1.2. Caracterización química del sedimento del Wetland Natural (WN) (ND= no detectado LD=límite de detección).

Parámetros	WN
Cr (mg g ⁻¹)	ND (LD=0,005)
Ni (mg g ⁻¹)	ND (LD=0,005)
Zn (mg g ⁻¹)	ND (LD=0,005)
PT (mg g ⁻¹)	0,108

La altura de plantas aumentó en todos los tratamientos durante la experiencia, no presentando diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones de pH y salinidad estudiadas (Fig. 1.1). En cuanto a la tasa de crecimiento relativo y las concentraciones de clorofila no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos analizados (Figs. 1.2. y 1.3). El porcentaje de aumento de clorofila fue positivo en todos los tratamientos y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Las plantas sometidas a una salinidad de 8000 mg L⁻¹ presentaron sales adheridas a la superficie de las hojas (Fig. 1.4). En cuanto a la apariencia externa, se observó que las hojas fueron más gruesas y rígidas en aquellos tratamientos con alta salinidad que aquellas sometidas a baja salinidad. Con respecto a los parámetros morfométricos de las raíces, solo se analizaron en plantas que correspondían a los tratamientos con valores extremos de salinidad y pH para poder observar claramente los posibles cambios que pudieran suceder en este órgano. Se detectaron diferencias significativas en los parámetros morfométricos internos de la raíz, presentando las plantas sometidas a pH 10 y 8000 mg L⁻¹ valores significativamente menores de ATR, ATM y ATV (Fig. 1.5). Considerando que las tasas de crecimiento relativo no disminuyeron y que *T. domingensis* mostró plasticidad fenotípica en su anatomía radicular interna, esta especie pudo adaptarse y así tolerar condiciones poco favorables para su desarrollo.

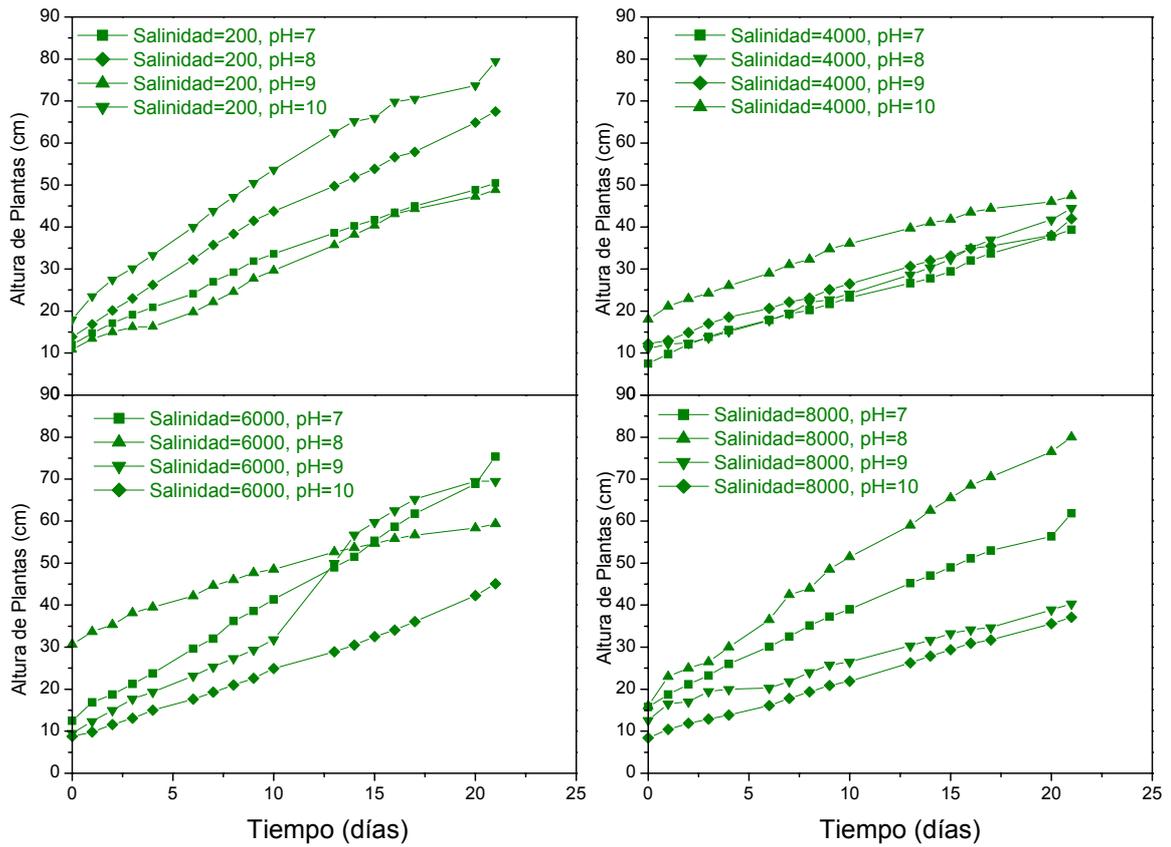


Fig. 1.1. Altura de plantas medidas en todos los tratamientos a lo largo del tiempo de experimentación.

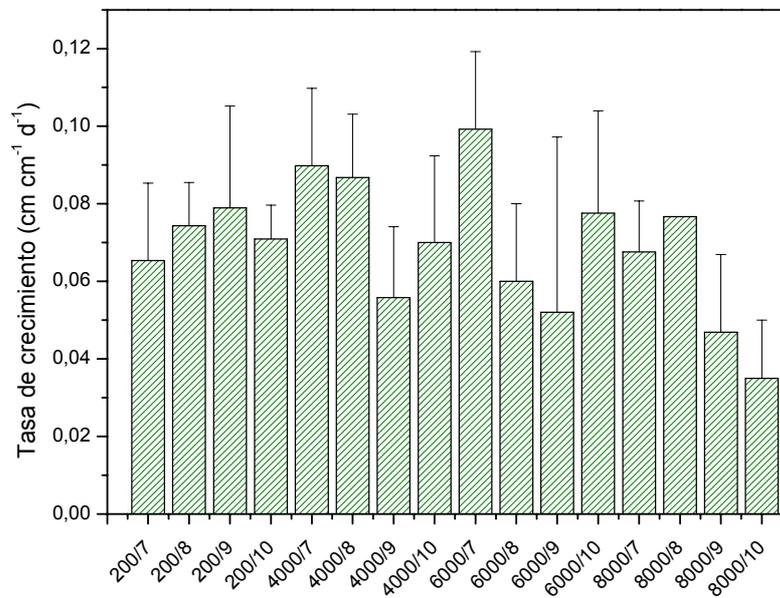


Fig. 1.2. Tasas de Crecimiento (R) ($\text{cm cm}^{-1} \text{d}^{-1}$) relativos de acuerdo a la altura de plantas, tomados en cada tratamiento.

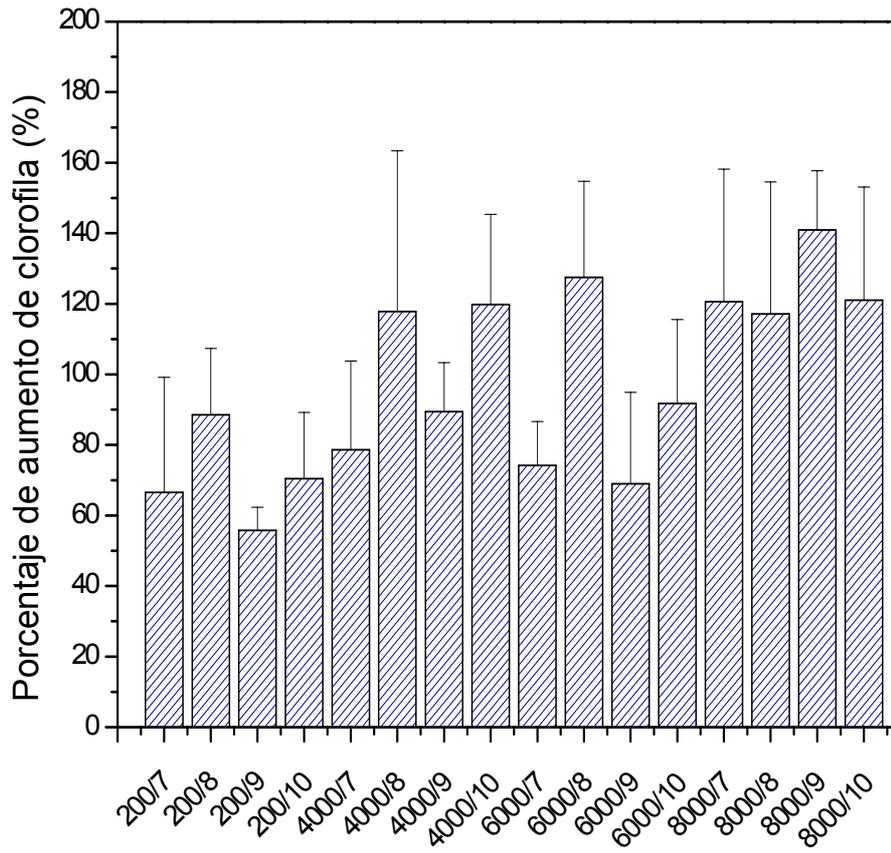


Fig. 1.3. Porcentaje de aumento de clorofila (%) de *T. domingensis* en todos los tratamientos aplicados.

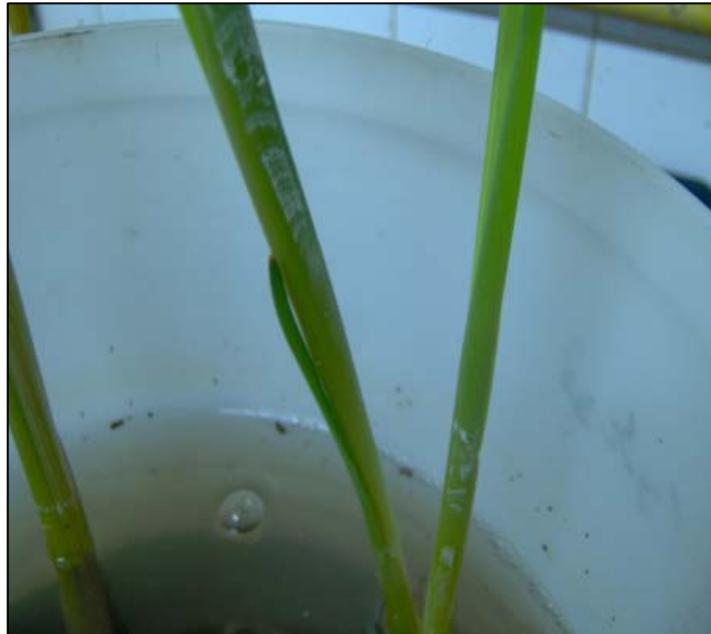


Fig. 1.4. Fotografía de las sales adheridas a las superficies de las hojas.

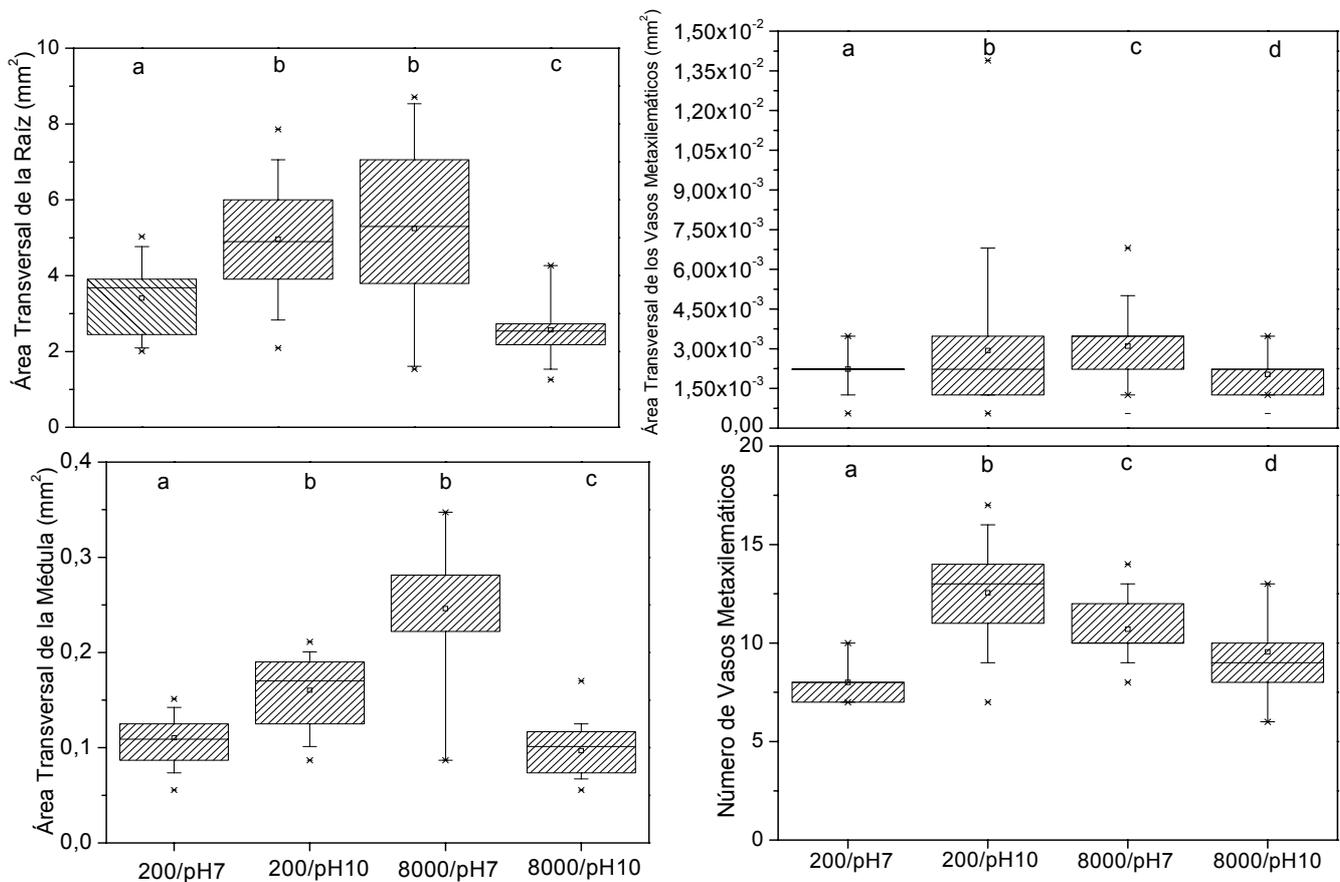


Fig. 1.5. Parámetros morfométricos internos de la raíz medidos en los tratamientos con pH y salinidad extremos. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

1.2.4. Consideraciones finales de la experiencia preliminar:

T. domingensis pudo tolerar condiciones drásticas como pH=10 y salinidad 8000 mg L⁻¹ ya que no se observaron signos de senescencia de las plantas, pero si se produjeron modificaciones en su morfología radicular interna. Estos resultados demuestran que es una especie que puede ser utilizada en wetlands construidos para tratamiento de efluentes con alta salinidad y pH, características comunes de muchos efluentes industriales.

1.3. Experiencia N° 2: Adaptabilidad de plantas de *T. domingensis* provenientes de un humedal construido y de un humedal natural a elevados pH y salinidad.

1.3.1. Objetivo:

Luego de realizar la experiencia preliminar y de acuerdo a los resultados obtenidos en la misma, se llevó a cabo una experiencia definitiva utilizando los valores extremos seleccionados en la experiencia anterior. El objetivo de este experimento fue comparar la adaptabilidad de plantas de *T. domingensis* provenientes de un humedal construido a las condiciones de pH y conductividad de un humedal natural y plantas provenientes de un humedal natural expuestas a condiciones de alto pH y salinidad, similares a las encontradas en un wetland construidos.

1.3.2. Metodología:

Recolección de las Plantas y Diseño Experimental:

Plantas en buenas condiciones y de similar tamaño fueron seleccionadas de un wetland construido (WC) y de un wetland natural (WN, sitio 2, sección Materiales y Métodos).

Se utilizaron acuarios plásticos de 10 L de capacidad en donde se colocaron dos plantas y sedimento. La composición química del sedimento se detalla en la experiencia anterior. Las plantas se aclimataron durante 10 días bajo fotoperíodo natural (12:12) agregándose agua periódicamente. Luego de la aclimatación las plantas fueron cortadas a una altura de 19 cm aproximadamente. La experiencia tuvo una duración de 90 días. Al inicio del experimento se agregaron a cada acuario tres litros de las soluciones con los valores de salinidad y pH. De la misma manera que en la experiencia preliminar, se utilizaron soluciones buffer para alcanzar los valores de pH a estudiar y sulfato de Sodio (Na_2SO_4) para variar la salinidad. Los tratamientos se dispusieron por triplicado de acuerdo al siguiente esquema:

Salinidad/pH	Plantas WC	Plantas WN
8000 mg L ⁻¹ pH 10 (valores encontrados en el WC)	X	X
8000 mg L ⁻¹ pH 7	X	X
200 mg L ⁻¹ pH 10	X	X
200 mg L ⁻¹ pH 7 (valores característicos encontrados en el WN)	X	X

Determinaciones Analíticas:

La caracterización fisicoquímica y química del agua y del sedimento del sitio de muestreo, se llevaron a cabo siguiendo las técnicas explicadas en la sección de materiales y métodos.

Estudio de la vegetación:

La apariencia externa de las plantas fue observada con el fin de detectar posibles signos de senescencia. Periódicamente, se midió la altura de plantas y se calculó la tasa de crecimiento relativo, de acuerdo a la ecuación que se explica en la sección materiales y métodos. Se midieron las concentraciones de clorofila al inicio y al finalizar el experimento, según la técnica explicada en la sección materiales y métodos.

Al finalizar la experiencia se realizaron cortes transversales de raíces que se examinaron en microscopio óptico. Se analizaron 30 secciones en cada tratamiento donde se midió el ATR, ATM, NV y ATV. Además se realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido (MEB) y microanálisis de rayos X al finalizar la experiencia.

Análisis Estadístico:

Se utilizó Análisis de Variancia de dos vías para determinar el efecto de la salinidad y el pH sobre la tasa de crecimiento y la concentración de clorofila, en plantas del WN y del WC. La normalidad de los residuos fue analizados gráficamente y homogeneidad de variancias fue chequeado aplicando test de Barlett's. Debido a que los parámetros de la morfología interna de la raíz (ATR, ATM, ATV y número de vasos) no presentaron una distribución normal, se realizaron test no paramétricos. Se aplicó el análisis de Kruskal-Wallis para testear las diferencias entre los parámetros morfométricos medidos en las raíces. Cuando se presentaron diferencias estadísticamente significativas, el test de Wilcoxon se utilizó para comparar los tratamientos entre sí.

1.3.3. Resultados:

Las características del agua y del sedimento de cada sitio de recolección de plantas (WC y WN) se muestran en la Tabla 1.3 y 1.4 respectivamente.

Tabla 1.3. Caracterización química del Wetland natural y de la entrada del Wetland Construido (WN y WC respectivamente) (ND=no detectado, LD=límite de detección).

Parámetros	WN	WC (entrada)
pH	7,91	12,62
Conductividad ($\mu\text{mho cm}^{-1}$)	208	5200
Sólidos Totales (mg L^{-1})	149,2	3145,3
Alcalinidad (CaCO_3) (mg L^{-1})	105,2	1427,2
HCO_3^- (mg L^{-1})	128,1	ND
CO_3^{2-} (mg L^{-1})	ND	483,2
Cl^- (mg L^{-1})	10,6	257,4
SO_4^{2-} (mg L^{-1})	8,2	759,2
Dureza Total (CaCO_3) (mg L^{-1})	33,6	623,2
Ca^{2+} (mg L^{-1})	9,8	249,3
Mg^{2+} (mg L^{-1})	2,2	0,5
Na^+ (mg L^{-1})	35,1	834,2
K^+ (mg L^{-1})	11,1	18,2
Fe (mg L^{-1})	0,29	53,41
Cr (mg L^{-1})	DN (LD=0.005)	0,062
Ni (mg L^{-1})	DN (LD=0.005)	0,045
Zn (mg L^{-1})	DN (LD=0.005)	0,025
PRS (mg L^{-1})	0,015	0,040
PT (mg L^{-1})	0,069	0,085
NO_2^- (mg L^{-1})	DN (LD= 0.005)	0,170
NO_3^- (mg L^{-1})	0,63	27,81
NH_4^+ (mg L^{-1})	2,16	3,97
DBO (mg L^{-1})	3,0	243,4
DQO (mg L^{-1})	6,0	982,5
OD (mg L^{-1})	6,51	5,43

Tabla 1.4. Caracterización Físico-Química del sedimento comercial (SC), del Wetland construido (WC) y del Wetland Natural (WN) (ND= no detectado LD=límite de detección).

Parámetros	SC	WC	WN
Materia orgánica	8%	—	—
pH	7,67	—	—
Cr (mg g^{-1})	0,015	0,488	ND (LD=0.005)
Ni (mg g^{-1})	0,006	0,408	ND (LD=0.005)
Zn (mg g^{-1})	0,130	0,054	ND (LD=0.005)
PT (mg g^{-1})	0,571	1,370	0,119

Las plantas provenientes del wetland construido mostraron las mayores tasas de crecimiento y porcentajes de aumento de clorofila en el tratamiento 8000/10 (condiciones típicas de los efluentes tratados en el WC). En las plantas del WN, las mayores tasas de

crecimiento y aumento de clorofila fueron observados en los tratamientos 200/7, probablemente debido a que este tratamiento presenta los valores normales de salinidad y pH del agua del WN (Figs. 1.6 y 1.7).

Las áreas transversales de las raíces de las plantas del WC fueron significativamente menores que las de las plantas del WN, con excepción del tratamiento 200/10 (Fig. 1.8a). La mayor área de raíces fue registrada en las plantas del WN en el tratamiento 200/7. En las áreas transversales de las raíces de las plantas de WC no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos 8000/10 y 8000/7 y entre los tratamientos 200/10 y 200/7. Las ATM de las plantas del WC fueron menores en los tratamientos con alta salinidad (8000/7 y 8000/10) que en los otros tratamientos (Fig. 1.8b). Las plantas del WN mostraron una mayor área transversal de médula que las plantas del WC en el tratamiento 8000/10 y un menor valor en el tratamiento 200/10.

El más alto valor de ATM fue observado en las plantas provenientes del WN en el tratamiento 8000/10. En los tratamientos 8000/7 y 200/10 las plantas provenientes del WC mostraron ATV que las de las plantas del WN (Fig. 1.8c). En los tratamientos 8000/7 y 200/10 las plantas del WC mostraron mayores áreas de vasos metaxilemáticos que las que se obtuvieron en las plantas del WN (Fig. 1.8c). En las plantas provenientes del WC las ATV de los tratamientos de mayor salinidad (8000/7 y 8000/10) fueron significativamente menores que las obtenidas en los otros tratamientos. La mayor ATV en las plantas del WN fue observada en el tratamiento 8000/10. Los mayores NV fueron observados en las plantas del WN en el tratamiento 8000/10. El valor más alto de NV fue observado en las plantas de WN en el tratamiento 8000/10 (Fig. 1.8d). En las plantas provenientes del WC, los NV fueron menores en los tratamientos de mayor salinidad (8000/7 y 8000/10) que en los otros tratamientos.

Las observaciones realizadas por microscopía electrónica (Fig. 1.9) permitieron determinar que los tejidos de las plantas del WC se encontraban en buenas condiciones, excepto en el tratamiento 200/7, en el cual los tejidos foliares y radiculares no estuvieron claramente diferenciados, lo que indica un daño evidente. Por el contrario, para las plantas del WN en el tratamiento de 8000/10, los tejidos radiculares y foliares no se diferenciaron claramente mostrando daños severos y deshidratación, mientras que las plantas en el tratamiento 200/7 se encontraban en condiciones normales.

De acuerdo con el microanálisis de rayos X, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos de Si en los tejidos de las plantas provenientes del WC y WN. El contenido relativo de Si en % (w/w) que se encuentra en los tejidos de las plantas

provenientes del WC fueron 2-19% y 1-3% para las raíces y hojas, respectivamente. Para los tejidos de las plantas del WN los valores fueron de 1-18% y 1-4% para las raíces y hojas, respectivamente. Debido a la alta abundancia relativa del Si (proveniente de los sedimentos), tuvo que ser eliminado de la tabla del microanálisis de rayos X para que no afecte a los demás elementos encontrados, por lo tanto estos debieron ser calculados nuevamente (Tabla 1.5).

En todos los tratamientos, Na, S, Cl, K y Ca presentaron las mayores proporciones en los tejidos de las plantas. El Cl fue significativamente superior en hojas que en raíces en todos los casos. En las hojas de las plantas del WC, el Ca fue sustituido por el K cuando la salinidad incrementó. En raíces, el Na reemplazó al K y el S reemplazó al Cl. En las hojas y raíces de las plantas del WN, el Ca fue sustituido por el Na en el tratamiento 8000/10. Nuestro interés se enfocó en el Na y el S en tejidos, ya que fueron los principales elementos de la solución utilizada (tratamiento de 8000/10). El Na en las hojas de las plantas provenientes del WC fue significativamente menor que el de los valores obtenidos en las plantas del WN. En las plantas provenientes del WC, Na fue acumulado en la epidermis y en el parénquima de las raíces, mientras que en la médula se observó una baja acumulación. En comparación con las raíces de las plantas del WC, un mayor valor de Na se observó en la médula de las raíces de las plantas del WN. Las hojas de las plantas del WC mostraron mayores valores de S que la de los obtenidos en las hojas de las plantas del WN. Aunque el S se acumuló en las raíces de las plantas del WC y WN, su contenido en las raíces de las plantas del WN fueron los más altos.

En los tratamientos 8000/7 y 8000/10 se observó deshidratación y presencia de sal adherida a la epidermis de las hojas de las plantas provenientes del WN (Fig. 1.10). Esto no fue observado en las plantas provenientes del WC.

Tabla 1.5. Proporción relativa en % (w / w) de las hojas y raíces de microanálisis de rayos X en los diferentes tratamientos de salinidad (mg L⁻¹) y pH (<1 representa los valores por debajo del límite de detección).

Tratamientos	Zona	Na	Mg	Al	P	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Ti
Hojas												
WC (8000/pH10)	Adaxial	3	1	1	<1	18	20	37	19	<1	<1	<1
	Mesófilo	3	2	<1	1	14	25	33	21	<1	<1	<1
	Abaxial	2	1	1	1	20	14	36	21	1	1	<1
WN (8000/pH10)	Adaxial	11	2	2	7	6	32	25	8	<1	<1	<1
	Mesófilo	12	1	1	6	4	37	25	13	<1	<1	<1
	Abaxial	13	2	3	5	6	32	16	10	<1	1	<1
WC (200/pH7)	Adaxial	2	3	1	3	15	26	19	28	<1	<1	<1
	Mesófilo	6	8	9	1	7	33	17	17	<1	<1	<1
	Abaxial	1	4	1	2	14	27	18	29	<1	1	<1
WN (200/pH7)	Adaxial	<1	3	<1	3	10	11	51	20	1	<1	<1
	Mesófilo	<1	2	<1	4	5	23	57	7	2	<1	<1
	Abaxial	1	5	1	5	5	15	43	20	2	1	<1
Raíz												
WC (8000/pH10)	Epidermis	14	3	3	2	18	2	8	29	<1	9	1
	Parénquima	27	9	6	2	15	5	8	8	<1	5	2
	Médula	1	<1	<1	<1	33	9	22	25	<1	5	<1
WN (8000/pH10)	Epidermis	16	2	2	3	32	3	19	14	<1	1	<1
	Parénquima	20	2	1	2	37	3	19	14	<1	<1	<1
	Médula	22	2	<1	7	37	6	4	20	1	<1	<1
WC (200/pH7)	Epidermis	9	2	10	1	3	3	31	8	<1	3	1
	Parénquima	15	2	<1	2	2	3	56	18	<1	<1	<1
	Médula	2	2	<1	4	2	5	54	21	<1	<1	<1
WN (200/pH7)	Epidermis	<1	3	2	6	2	<1	42	31	<1	9	<1
	Parénquima	<1	4	5	5	1	1	47	21	<1	2	<1
	Médula	<1	3	1	5	3	<1	63	15	<1	1	<1

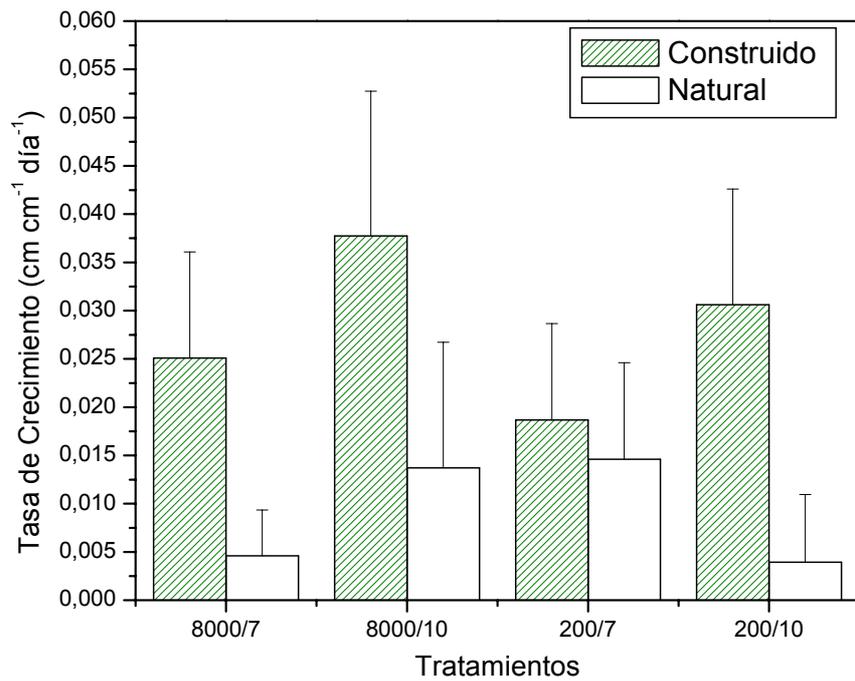


Fig. 1.6. Tasa de Crecimientos de plantas (cm cm⁻¹ d⁻¹) de provenientes de un wetland natural y uno construido, sometidos a valores extremos de pH y salinidad.

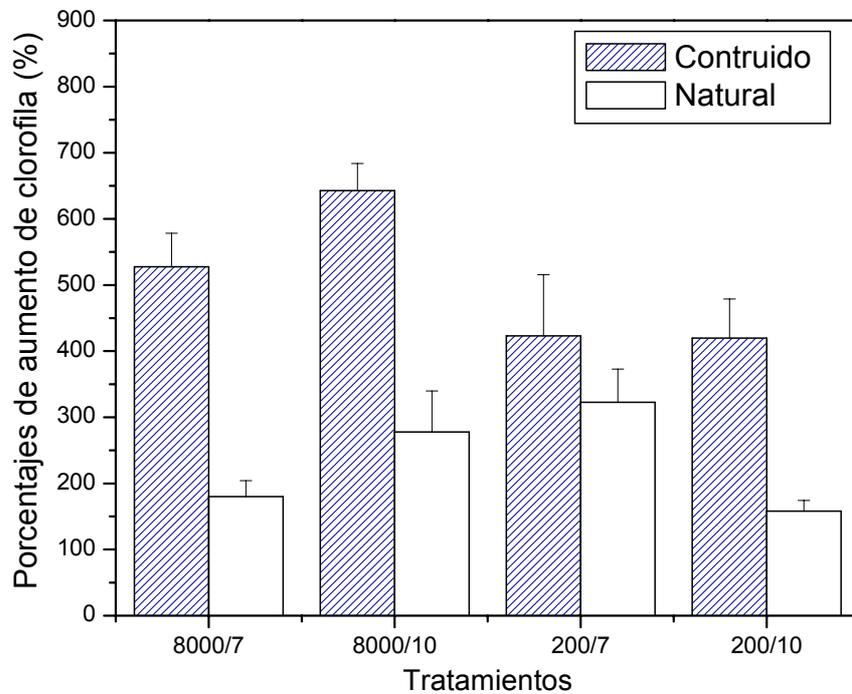


Fig. 1.7. Porcentaje de aumento de clorofila (%) de plantas *T. domingensis* provenientes de un WN y un WC.

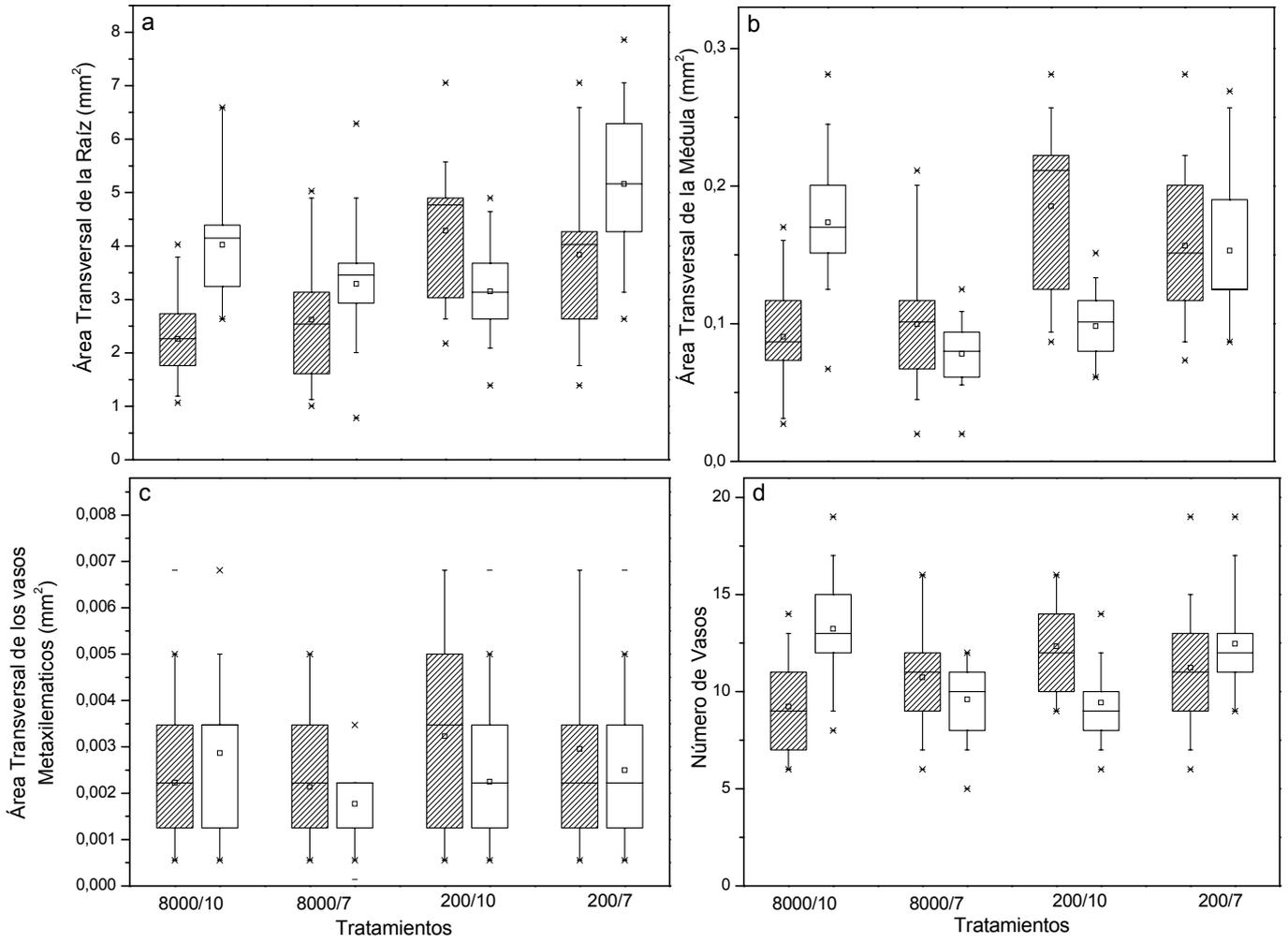


Fig. 1.8. Parámetros morfométricos internos de la raíz tomadas en plantas provenientes de WN y un WC, las cajas rellenas son los parámetros medidos en plantas de un WC y las cajas vacías son WN.

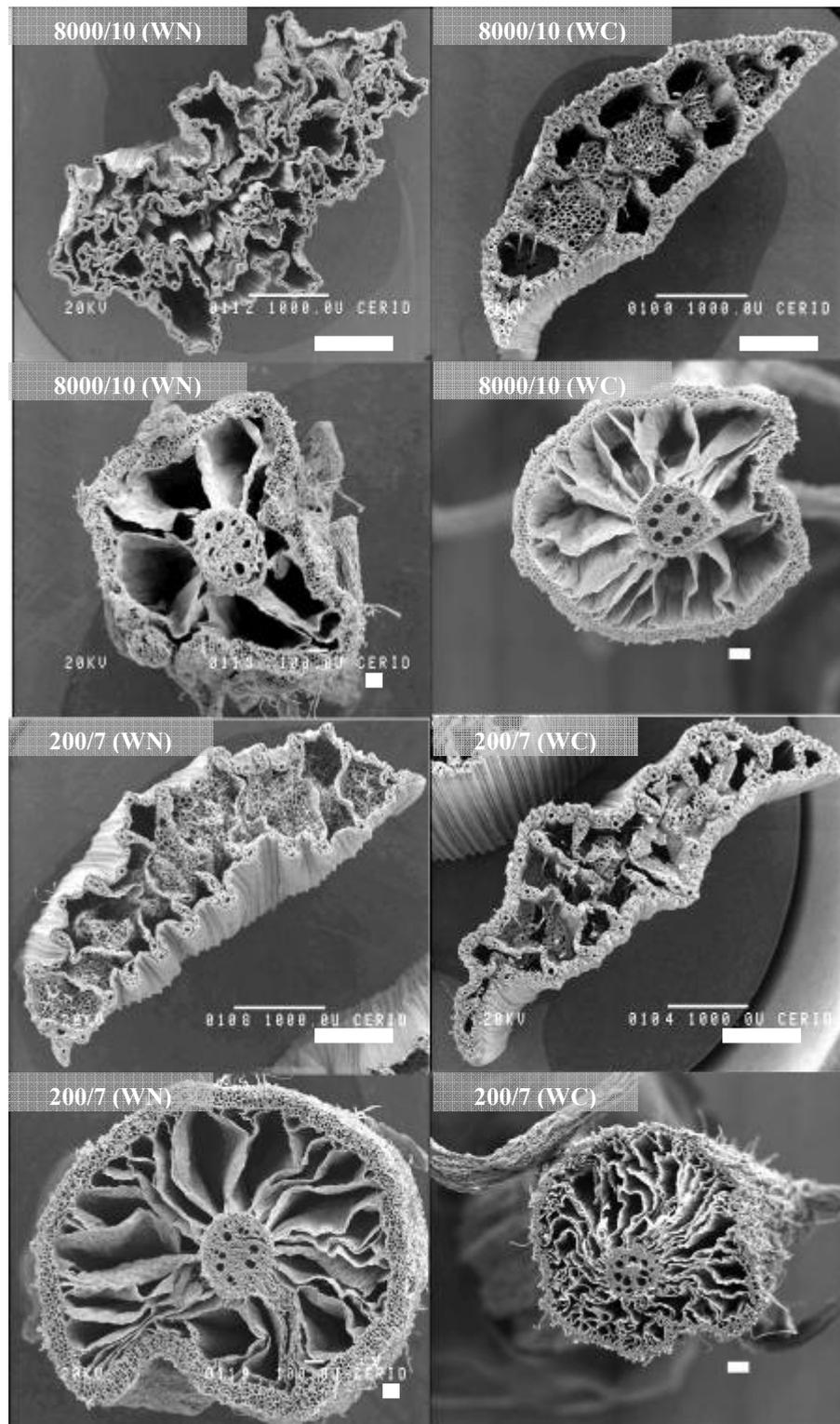


Fig. 1.9. Imágenes de los cortes transversales realizados bajo SEM-EDAX con energía 20kV en plantas de un WN y un WC.



Fig. 1.10. Fotografía de la sal adherida a la epidermis de las hojas de plantas provenientes de un wetland Natural (WN).

1.3.4. Consideraciones finales:

Las plantas del WC tienen adaptaciones fisiológicas y morfológicas para tolerar altos pH y salinidad. Contrariamente, ellas mostraron estrés cuando fueron expuestas a condiciones de pH y salinidad que son generalmente encontradas en aguas del WN (tratamiento 200/7). Las adaptaciones de las plantas del WC fueron demostradas por la mayor tasa de crecimiento relativo y el incremento de la clorofila en comparación con los obtenidos en las plantas del WN.

Por otro lado las plantas del WN mostraron estrés cuando ellas fueron expuestas a altas condiciones de pH y salinidad, normalmente encontradas en WC. Estos resultados denotan que es necesaria una adecuada aclimatación de las plantas para favorecer la adaptabilidad de *T. domingensis* y tolerar las condiciones del efluente y la supervivencia en el wetland.

A pesar de que *T. domingensis* no es una especie halófila y no posee estructuras para tolerar y excretar sales, es capaz de modificar su morfología para poder adaptarse a las condiciones extremas, como la exposición a altos valores de pH y salinidad.

Debido a su capacidad adaptativa *T. domingensis* es una buena opción para tratar efluentes con altos pH y salinidad.

1.4. Discusión del Capítulo:

En comparación con las plantas del WN, las mayores tasas de crecimiento y porcentajes de aumento de clorofila fueron observados en las plantas del WC, demostrando que estas plantas ya estaban modificadas no solo su fisiología sino también su morfología con el fin de tolerar las condiciones presentes en el efluente industrial a los que están permanentemente expuestas. Por lo tanto estas ya poseen adaptaciones para tolerar las condiciones extremas de pH y la salinidad estudiados en este trabajo.

Los efectos de la salinidad observados en las plantas del WN fueron coincidentes con lo reportados por Nilratnisakorn et al. (2007) quienes observaron que la tasa de crecimiento de *T. angustifolia* fue afectada por efluentes con alta salinidad provenientes de una fábrica de tinturas sintéticas. Ellos encontraron que la inhibición de la fotosíntesis fue debido a la precipitación de cristales de sal de Na en hojas y raíces que causan la obstrucción del transporte de solutos. Macek y Rejmánková (2007) encontraron que el crecimiento vertical y horizontal de plantas de *T. domingensis* fue limitada por la alta salinidad. Glenn et al. (1995) observaron que a una concentración de 9 ppt de NaCl, la altura y el número de nuevos tallos de *T. domingensis* presentaron un decrecimiento significativo. Munns et al. (1993) sugirieron que el crecimiento bajo salinidad es inhibida por dos fases. Inicialmente (fase 1), el crecimiento es afectado debido a las respuestas celulares a los efectos osmóticos. En la siguiente fase (fase 2), el crecimiento es reducido debido a los efectos tóxicos de las sales acumuladas.

La estructura de las raíces de las plantas del WC fue modificado por la salinidad, mientras que el pH no produjo cambios en este parámetro. Por otro lado, el pH y la salinidad producen cambios en la estructura de las raíces de las plantas de WN. Dyhr-Jensen y Brix (1996, encontraron que a pH 3,5 *T. latifolia* mostraron una tasa de crecimiento relativa significativamente menor que las obtenidas a valores de pH 5,0, 6,5 y 8,0. Valores de pH extremadamente bajos son tóxicas para el crecimiento de especies de *Typha* sp. debido a un

incremento pasivo de la entrada de H^+ disminuiría el gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática y, por tanto la captación de cationes.

En el caso de macrófitas flotantes libres, Hadad et al. (2006) encontraron que a valores de pH de 10 fueron tóxicos para el crecimiento de *S. herzogii*, *P. stratiotes* y *E. crassipes*. También, estos autores observaron una tasa de crecimiento negativa en *E. crassipes*. A una conductividad de $4000 \mu\text{mho cm}^{-1}$. El valor de pH fue el mismo que los utilizados en nuestro experimento y la salinidad fue menor, lo que indica una mayor tolerancia de *T. domingensis* que las macrófitas flotantes estudiadas. Las plantas emergentes toleran la salinidad y pH mejor que las macrófitas flotantes. El sedimento actúa como una barrera que equilibra el sistema iónicamente, mejorando la tolerancia de las especies emergentes.

Al final del experimento definitivo los tejidos de las plantas del WC presentaron un estado saludable como fue observado en las imágenes obtenidas por el microscopio electrónico de barrido. Las hojas de las plantas del WC se estrechan en los tratamientos de salinidad elevada, lo que sugiere que la pérdida de soportes estructurales en hojas más estrechas puede contribuir a un menor crecimiento en altura.

Estas observaciones confirman la adaptación adquirida por las plantas del WC. Nilratnisakorn et al. (2007) observaron en imágenes de microscopio electrónico de barrido que raíces de *T. angustifolia* fueron dañadas después de ser sometidas al tratamiento con el efluentes de tintura, y el sodio cristalino fue depositados en las células de las raíces causando un decrecimiento en la evaporación y la transpiración.

En plantas del WC no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el Na de las hojas de los tratamientos 8000/10 y 200/7, indicando que este elemento no fue transportado a dichos órganos. La baja concentración de Na en la médula indica la menor movilidad en las plantas del WN. Esto es debido al hecho que los vasos metaxilemáticos localizados en la médula, son responsables transporte de sustancias a las partes aéreas.

Los mayores valores de S encontrados en la médula indicaron su transporte hacia las partes aéreas. La acumulación de Na en las raíces de las plantas del WC indica un mecanismo de protección que poseen las plantas para evitar daños en los tallos y para el balance de la presión osmótica (Amarante et al. 2006; Munns y Greenway 1980; Parida y Das 2005; Thomson 1975).

En plantas del WN la médula presentó altos valores de Na indicando el transporte de raíces a hojas. Coincidiendo con nuestros resultados, Nilratnisakorn et al. (2007) encontraron

que la acumulación de Na en hojas causó obstrucción del transporte de soluto el cual produjo la inhibición de la fotosíntesis en las hojas.

La excreción de sal es una muy eficiente manera de prevenir concentraciones excesivas en los tejidos fotosintéticos.

Estos mecanismos son típicos de especies que tienden a desarrollar características especiales localizados mayormente en la epidermis de las hojas, conocidos como glándulas de sal o pelos. Uno de los signos más obvios de la excreción es la sal incrustada en las hojas y tallos de estas especies con glándulas de sal o pelos (Popp 1995). Sin embargo, *T. domingensis* no posee ninguna de estas estructuras y las secreciones salinas observada en la superficie de la hoja (Fig. 4) fueron probablemente debido a la precipitación cuando el nivel del agua en el acuario decreció por evapotranspiración. Munns (2002) propuso que la tolerancia a la sal es debida a dos mecanismos: uno de ellos es para minimizar la entrada de sal dentro de la planta (acumulación en los tejidos fotosintéticos) y la otra es la de minimizar la concentración de sales en el citoplasma. Generalmente la exclusión de sal en algunas especies es una eficiente pero compleja manera de prevenir la toma masiva de iones en la zona de la raíz, permitiendo el menor ascenso y acumulación de sal en las partes aéreas de las plantas, especialmente en los órganos en donde se produce la transpiración.

La exclusión de sal está basada en la baja permeabilidad de las raíces para iones en presencia de alta salinidad externa.

Capítulo 2

ESTUDIO DE LA TOLERANCIA Y EFICIENCIA DE ACUMULACIÓN DE METALES DE *T. domingensis*

2.1. Introducción:

En el presente capítulo se determinó el rango de tolerancia aproximado que posee *T. domingensis* al ser expuesta a distintas concentraciones de Cr, Ni y Zn para poder realizar experiencias posteriores. Luego, con los resultados obtenidos en esta experiencia, se estudió la tolerancia y las respuestas morfológicas de *T. domingensis* a una solución combinada de Cr(III) + Ni(II) + Zn(II). Debido a que esta especie toleró las condiciones a las que fue expuesta, y de acuerdo a los resultados obtenidos en esta experiencia, se realizó un tercer experimento agregando mayores concentraciones de Cr, Ni, Zn y un nutriente (fósforo). Los metales fueron agregados en forma combinada y separada.

2.2 Experiencia N° 1: Estudio preliminar de la tolerancia a metales

2.2.1. Objetivo:

Determinar el rango de tolerancia aproximado de *T. domingensis* al ser expuesta a Cr, Ni y Zn.

2.2.2. Metodología:

Diseño Experimental:

Este experimento se realizó a fin de evaluar la tolerancia y las posibles modificaciones morfológicas en *T. domingensis* al ser expuesta a distintas concentraciones de Cr, Ni y Zn. Se recolectaron plantas de un ambiente natural (Sitio 1, 31° 38' 41" S, 60° 30' 51" O) perteneciente a la llanura de inundación de Río Paraná Medio. Las plantas fueron podadas para evitar que se dañen durante el transporte. El experimento se realizó en invernadero. Se colocaron dos plantas por en cada contenedor plástico en los que se agregó 4 Kg de sedimento. Las plantas se expusieron a un período de aclimatación de 15 días, durante el cual demostraron un crecimiento adecuado y, posteriormente, se volvieron a podar hasta una altura de 20 cm. A cada contenedor se le agregó 3 L de solución conteniendo los metales a estudiar por separado preparadas con agua del sitio de muestreo. La experiencia tuvo una duración de 30 días. Las plantas fueron sometidas a los siguientes tratamientos dispuestos por duplicado:

- 1) 20 mg Cr L⁻¹ (Cr 20)
- 2) 40 mg Cr L⁻¹ (Cr 40)
- 3) 60 mg Cr L⁻¹ (Cr 60)
- 4) 10 mg Ni L⁻¹ (Ni 10)
- 5) 20 mg Ni L⁻¹ (Ni 20)
- 6) 40 mg Ni L⁻¹ (Ni 40)
- 7) 20 mg Zn L⁻¹ (Zn 20)
- 8) 40 mg Zn L⁻¹ (Zn 40)
- 9) 60 mg Zn L⁻¹ (Zn 60)
- 10) 80 mg Zn L⁻¹ (Zn 80)
- 11) Control: sin agregado de metal

Estas concentraciones fueron seleccionadas teniendo en cuenta la toxicidad de estos metales observada en experiencias previas realizadas por el grupo de investigación y la tolerancia de la planta analizada en la bibliografía (Manios et al., 2003).

Estudio de la Vegetación:

Periódicamente, se midió la altura de plantas y se calculó la tasa de crecimiento relativo de acuerdo a la ecuación que se explica en la sección de Materiales y métodos. Se midieron las concentraciones de clorofila al inicio y al finalizar el experimento y de acuerdo a estos valores se calcularon los porcentajes de aumento de clorofila, según la técnica explicada en la sección de materiales y métodos.

Al finalizar la experiencia se realizaron cortes transversales de raíces que se examinaron en microscopio óptico. Se analizaron 30 secciones de raíces en los tratamientos de mayor concentración de metal, donde se midió el área transversal de las raíces (ATR), médula (ATM), número y área transversal de los vasos metaxilemáticos (NV y ATV, respectivamente).

Se calcularon los factores de translocación (concentración en hojas/concentración en raíces) y bioacumulación de metales (concentración en raíz/concentración en sedimento).

Análisis químicos:

Se efectuó una caracterización físico-química del agua del sitio de muestreo donde se recolectaron las plantas para la realización del experimento. Para caracterizar el agua del sitio de muestreo se siguieron las técnicas explicadas en la sección de materiales y métodos. También se determinaron las concentraciones de Cr, Ni y Zn en tejidos (hojas y raíces) y en sedimento del sitio de recolección de plantas.

En los contenedores se midió periódicamente el pH y la conductividad. Al inicio y al final de la experiencia se determinó la concentración de metales en agua y se determinaron los porcentajes de remoción para cada metal en agua.

Al final de la experiencia se determinó la concentración de metales en hojas, raíces, y del sedimento superficial y rizosférico.

Análisis Estadístico:

Se realizó análisis de la Variancia de una vía para determinar el efecto de los metales sobre la altura de las plantas y concentración de clorofila. Para determinar si existieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados para las concentraciones de metales en tejidos vegetales y sedimento rizosférico y superficial, se realizaron análisis de la varianza de dos vías (tratamientos: órganos vegetativos y tratamientos: sedimento superficial y rizosférico). Cuando se encontraron diferencias significativas, se aplicó el test de Duncan para diferenciar medias. Debido a que los parámetros de la morfología interna no presentaron una distribución normal, se aplicó el análisis de Kruskal-Wallis para testear si existieron diferencias entre los tratamientos. Cuando se presentaron diferencias estadísticamente significativas, el test de Wilcoxon se utilizó para comparar los tratamientos entre sí.

2.2.3. Resultados:

La caracterización físico-química del agua del sitio de muestreo donde se recolectaron las plantas para la realización del experimento se muestra en la Tabla 2.1. Las concentraciones de Cr, Ni y Zn en tejidos (hojas y raíces) y en sedimento del sitio de recolección de plantas se muestra en la Tabla 2.2.

Tabla 2.1. Caracterización físico química del agua del sitio de muestreo (Sitio 1) (ND=no detectado, LD=límite de detección).

Parámetros	WN
pH	7,52
Conductividad ($\mu\text{mho cm}^{-1}$)	203
Sólidos Totales (mg L^{-1})	147,1
Alcalinidad (CaCO_3) (mg L^{-1})	104,3
HCO_3^- (mg L^{-1})	126,1
CO_3^{2-} (mg L^{-1})	ND
Cl^- (mg L^{-1})	9,6
SO_4^{2-} (mg L^{-1})	8,2
Dureza Total (CaCO_3) (mg L^{-1})	32,7
Ca^{2+} (mg L^{-1})	9,3
Mg^{2+} (mg L^{-1})	2,5
Na^+ (mg L^{-1})	33,1
K^+ (mg L^{-1})	13,1
Fe (mg L^{-1})	0,32
Cr (mg L^{-1})	ND (LD=0.005)
Ni (mg L^{-1})	ND (LD=0.005)
Zn (mg L^{-1})	ND(LD=0.005)
PRS (mg L^{-1})	0,016
PT (mg L^{-1})	0,083
NO_2^- (mg L^{-1})	ND (LD= 0.005)
NO_3^- (mg L^{-1})	0,49
NH_4^+ (mg L^{-1})	2,54
DBO (mg L^{-1})	2,6
DQO (mg L^{-1})	5,4
OD (mg L^{-1})	5,62

Tabla 2.2. Caracterización química de los sedimentos comerciales (SC) y del wetland natural (WN) y vegetales (raíz, hoja y rizoma) del sitio de recolección (Sitio1).

Parámetros	SC	WN	Raíz	Rizoma	Hoja
Cr (mg g^{-1})	0,015	ND	0,041	ND	0,009
Ni (mg g^{-1})	0,006	ND	0,020	ND	0,002
Zn (mg g^{-1})	0,131	ND	0,280	ND	0,043
PT (mg g^{-1})	0,573	0,119	0,892	2,791	1,534

Las concentraciones de los metales en agua disminuyeron significativamente a lo largo del tiempo en todos los tratamientos (Fig. 2.1), alcanzándose a los 30 días del experimento los porcentajes de remoción que se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Porcentajes de remoción de metales en los distintos tratamientos.

Cr	% remoción
20	99,4
40	99,7
60	99,5
Ni	% remoción
10	95,6
20	97,8
40	98,5
Zn	% remoción
40	96,9
60	98,2
80	98,5

Al final de la experiencia, tanto en el sedimento superficial como en el rizosférico, las concentraciones de Cr fueron significativamente superiores a las de los otros metales. El sedimento superficial mostró concentraciones de los tres metales significativamente mayores que el sedimento rizosférico, excepto en el tratamiento Ni 20 (Fig. 2.2, Tabla 2.2).

Las hojas presentaron concentraciones significativamente inferiores que las de las raíces en todos los tratamientos, indicando una escasa translocación, que se refleja en el factor de translocación (Tabla 2.4; Fig. 2.3). Las concentraciones de metales en hojas se encuentran limitadas, debido a que todas llegan a la misma concentración, mientras que en las raíces las concentraciones son significativamente mayores (Fig. 2.3) y presentan una correlación positiva con las concentraciones de metales de cada tratamiento. La altura de plantas aumentó a lo largo del tiempo en todos los tratamientos durante la experiencia (Fig. 2.4.). En las tasas de crecimiento relativo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Fig. 2.5).

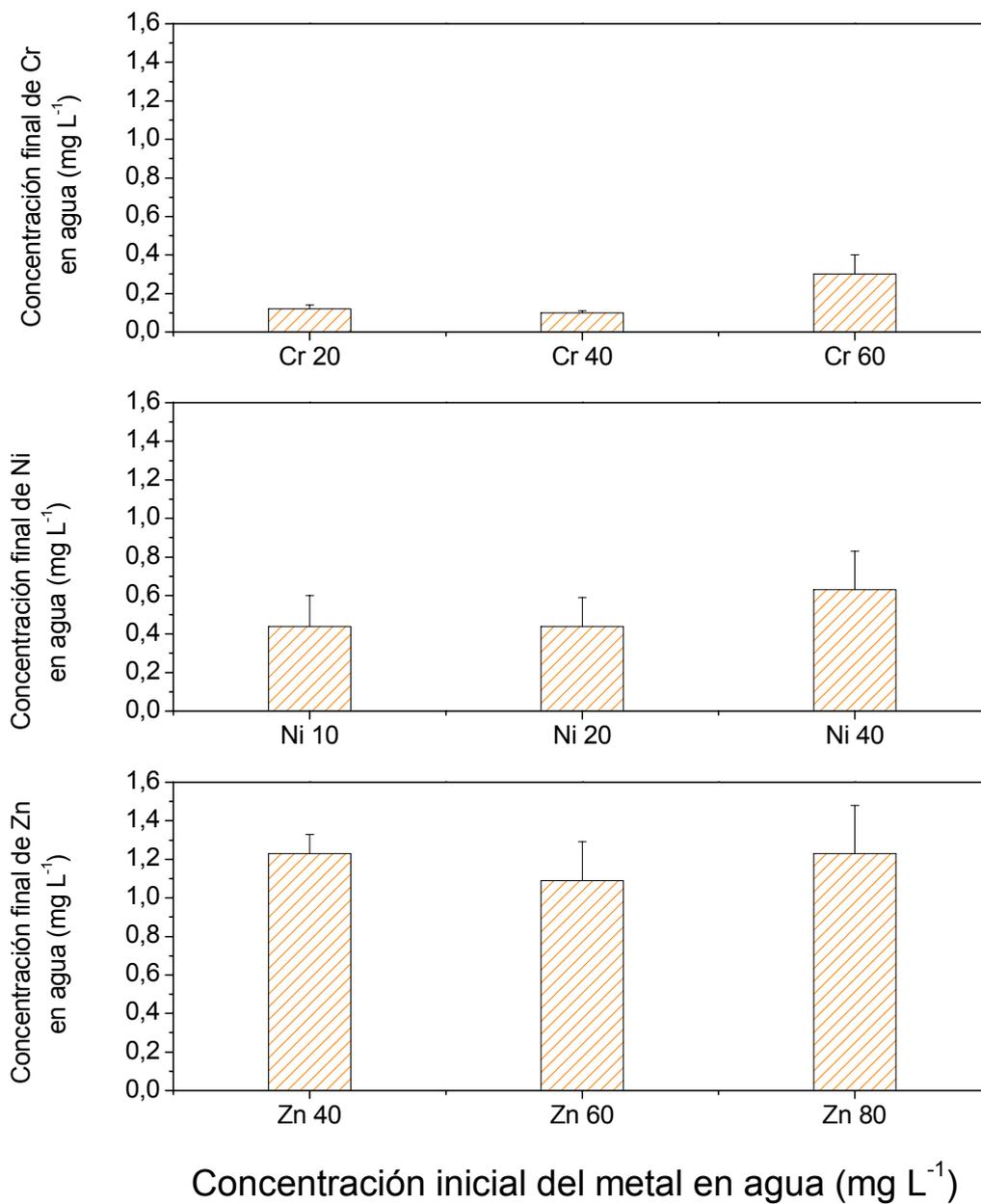
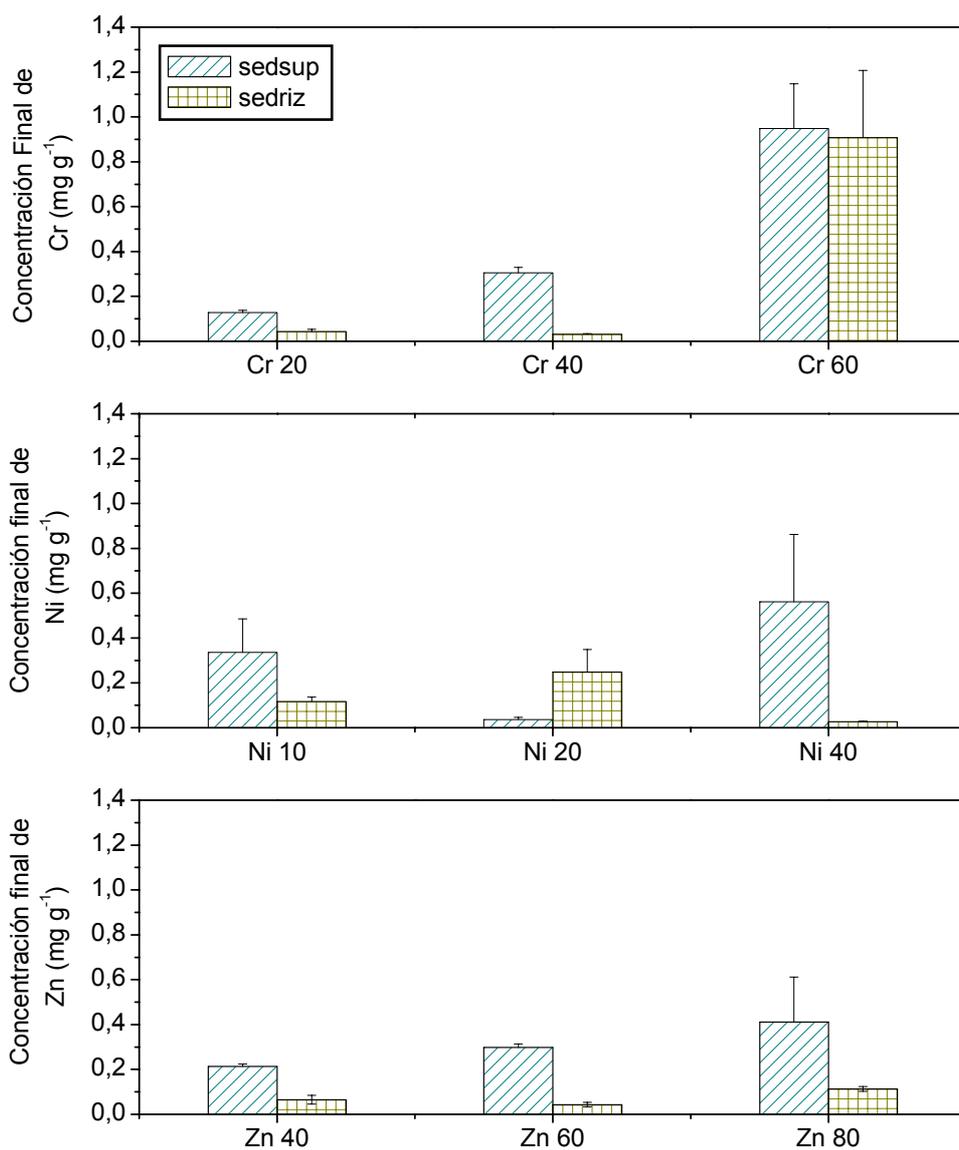


Fig. 2.1. Concentración de metales (Cr, Ni y Zn) en agua (mg L⁻¹) obtenida al final de la experiencia en cada tratamiento.



Concentración inicial del metal en sedimento superficial y rizosférico (mg g⁻¹)

Fig. 2.2. Concentración de Cr, Ni y Zn (mg g⁻¹) en sedimento superficial y sedimento rizosférico obtenida al final de la experiencia en cada tratamiento.

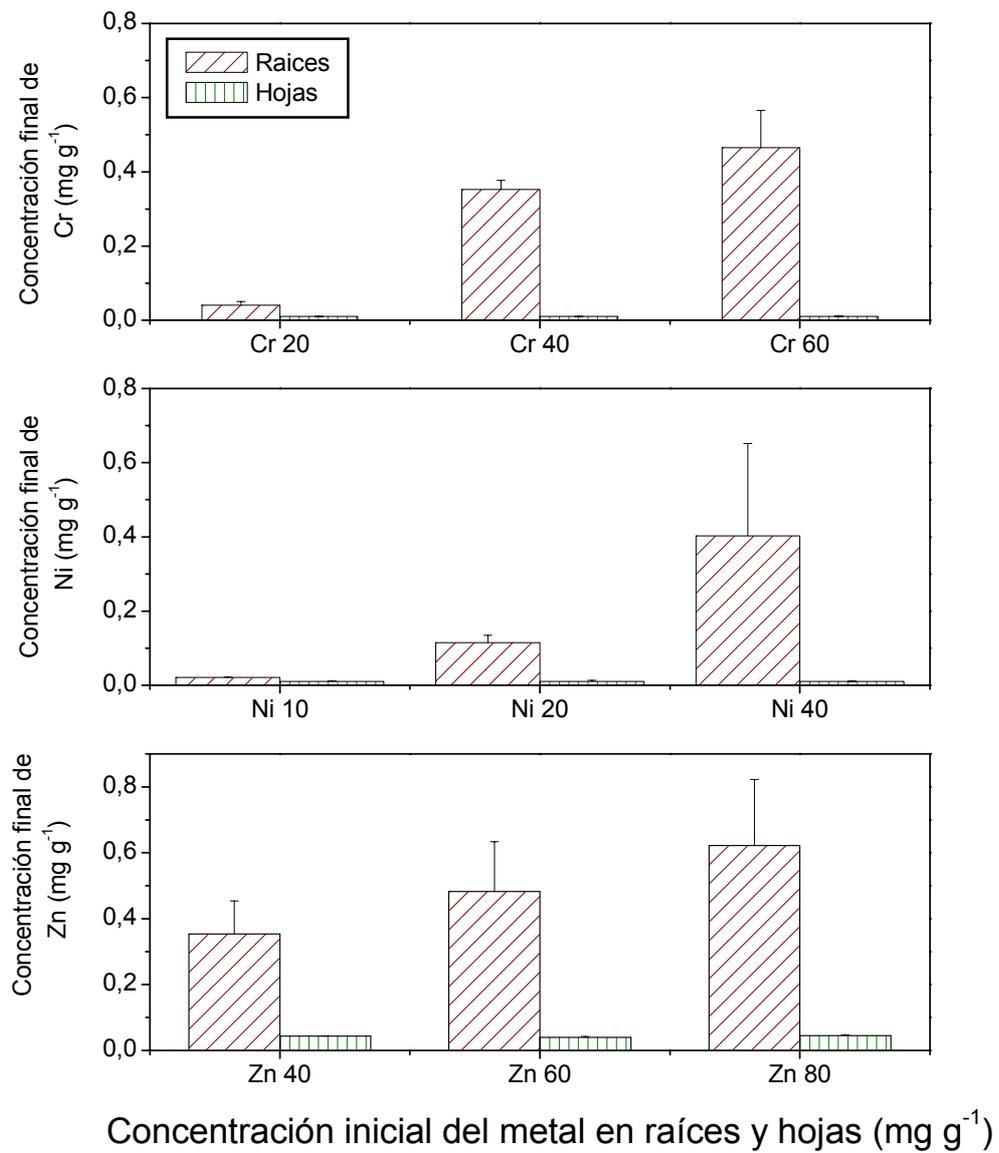


Fig. 2.3. Concentración de Cr, Ni y Zn (mg g^{-1}) en hojas y raíces de plantas de *T. domingensis*, obtenidas al final de la experiencia en cada tratamiento.

Tabla 2.4. Factores de bioacumulación y de translocación en plantas de *T. domingensis* en los distintos tratamientos. FT= Factor de translocación, FB= Factor de bioacumulación, SS=Sedimento Superficial, SR=Sedimento Rizosférico.

Tratamientos	FT	FB (SS)	FB (SR)
Cr 20	0,245	0,312	0,931
Cr 40	0,028	1,16	7,89
Cr 60	0,022	0,492	0,512
Ni 10	0,244	0,255	0,182
Ni 20	0,086	0,48	0,463
Ni 40	0,056	1,70	7,43
Zn 40	0,123	2,11	5,44
Zn 60	0,083	1,62	4,70
Zn 80	0,072	1,51	5,49

En los tratamientos con Cr no se observaron diferencias significativas con el porcentaje de aumento clorofila del control (Fig. 2.6). La mayor inhibición en la síntesis de clorofila produciendo el menor porcentaje de aumento, se observó en el tratamiento de Ni 40, siendo este valor significativamente menor que en Ni 10, Ni 20 y el control. El Zn no mostró diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Para el Zn no se observaron efectos tóxicos en este parámetro ya que no se produjo una disminución en la concentración de clorofila en ningún tratamiento (Fig. 2.6.)

Respecto de los parámetros morfológicos radiculares, se observó que el Zn 80 presentó el mayor ATR, mientras que Cr 60 y Ni 40 no presentaron diferencias significativas con el control (Fig. 2.7). En el ATM no se observaron diferencias significativas entre Zn 80 y el control. El ATM medido en el tratamiento de Ni 40 fue el más alto. Para el ATV no existieron diferencias significativas entre los tratamientos Zn 80 y Cr 60 ni tampoco entre Ni 40 y el control. En el caso del NV, el tratamiento de Ni 40 presentó el valor más alto. El NV del tratamiento Zn 80 fue significativamente menor que en el resto de los tratamientos (Fig. 2.7).

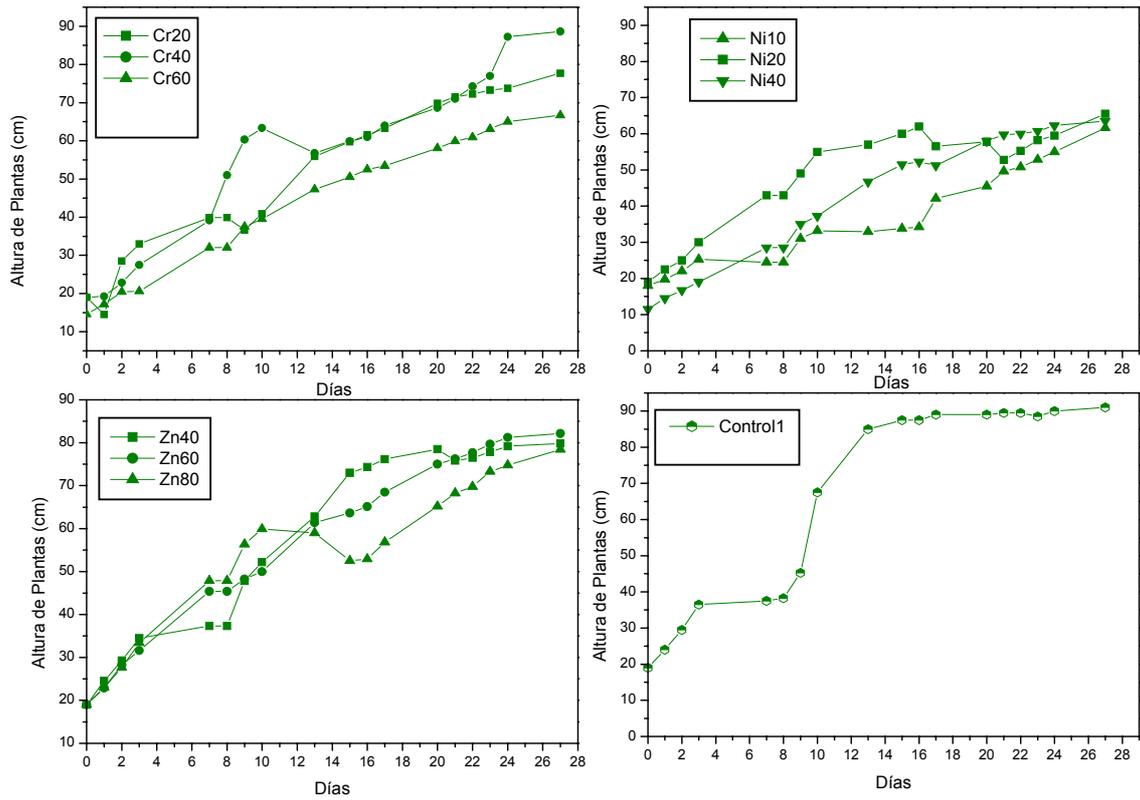


Fig. 2.4. Altura de plantas (cm) medidas periódicamente en plantas de *T. domingensis* en los distintos tratamientos.

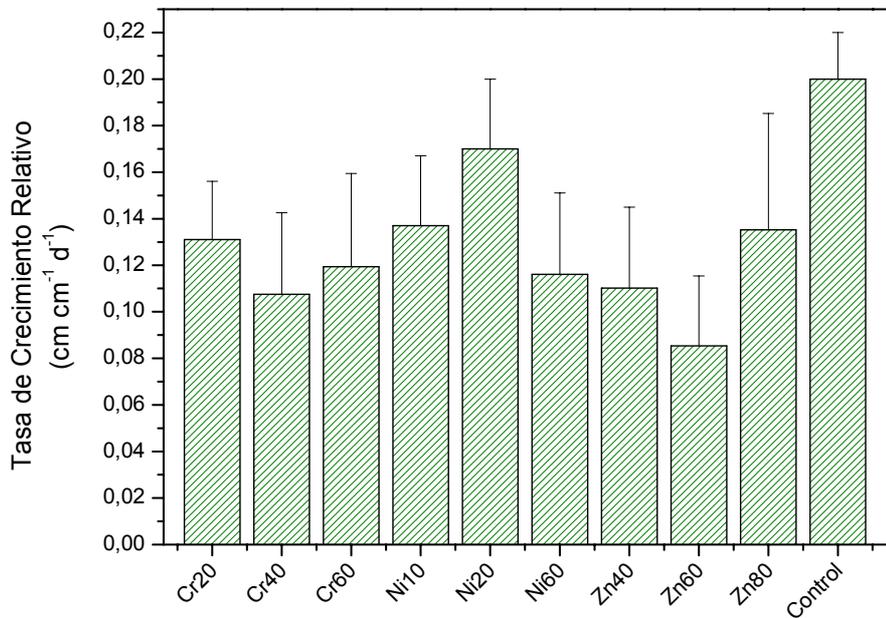


Fig. 2.5. Tasa de crecimiento relativo ($\text{cm cm}^{-1} \text{d}^{-1}$) basada en las altura de plantas en todos los tratamientos.

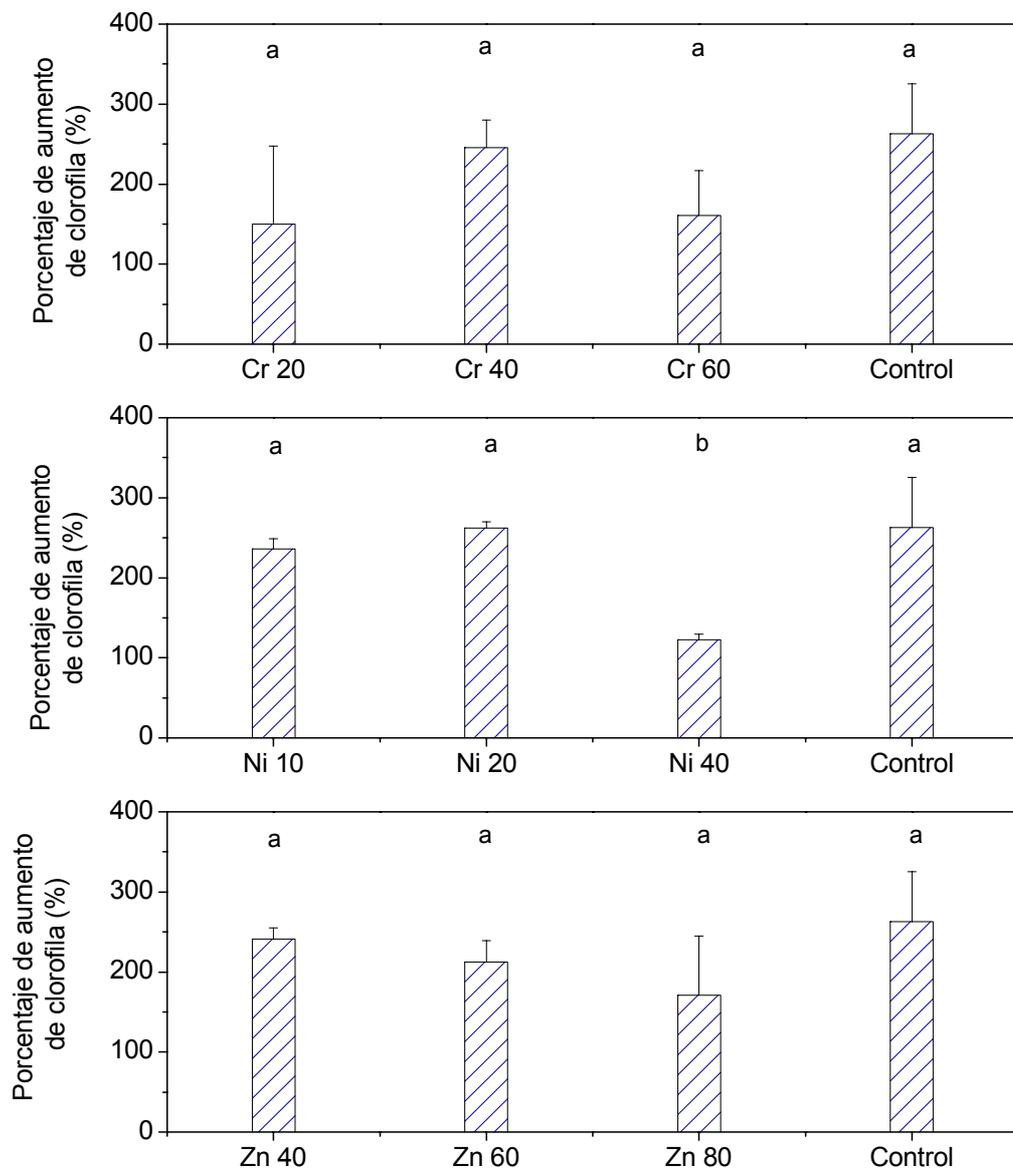


Fig. 2.6. Porcentaje de aumento de clorofila de plantas de *T. domingensis* obtenida en cada tratamiento al finalizar el experimento. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

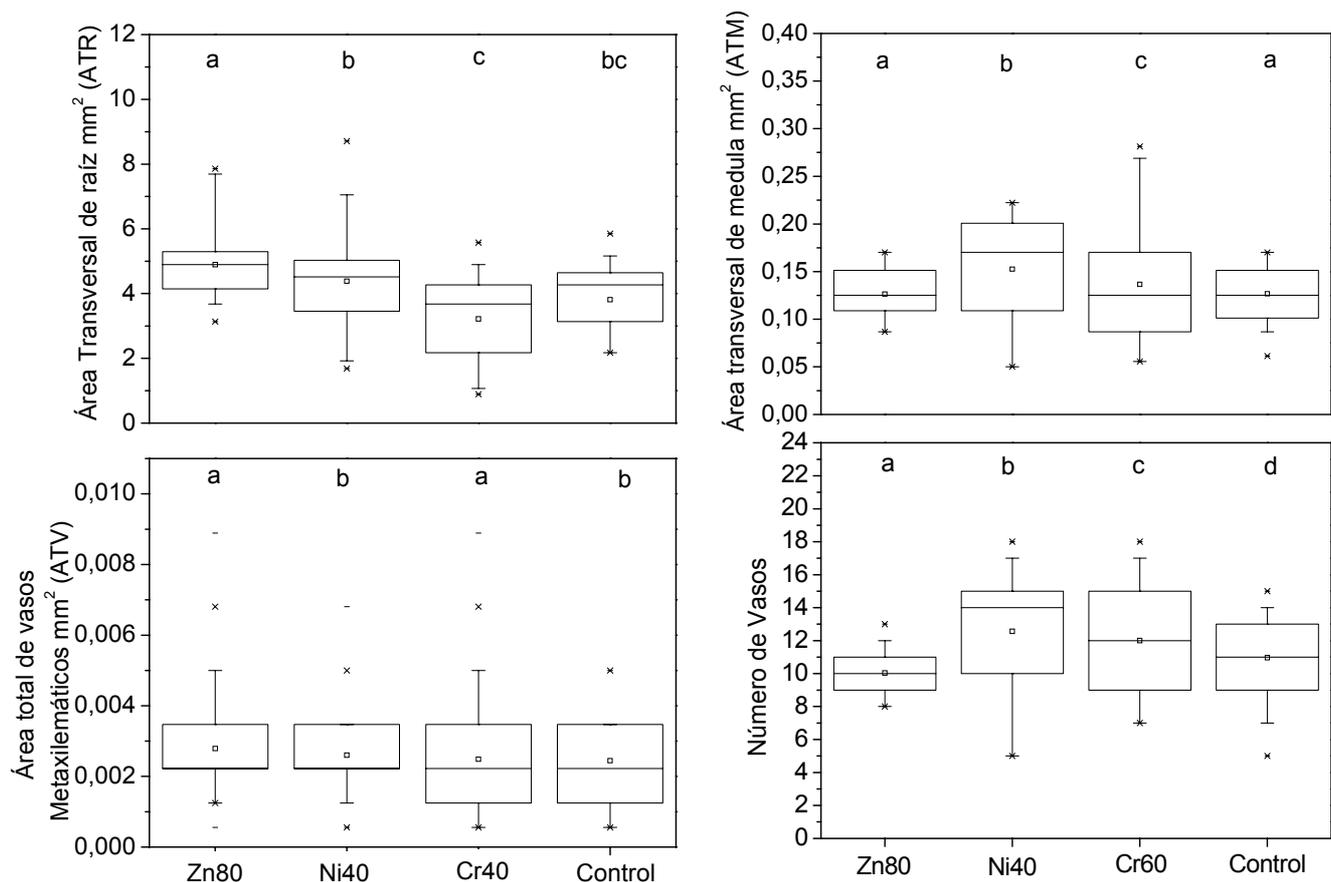


Fig. 2.7. Parámetros morfométricos internos (ATR, ATM, ATV y NV) de las raíces tomada de plantas de tratamientos con altas concentraciones de metales. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

2.2.4. Consideraciones finales:

En esta experiencia se pudo observar que la altura de plantas aumentó significativamente, no se observaron cambios en la morfología interna radicular, ni se registraron síntomas de muerte celular en ningún tratamiento, por esto se puede concluir que *T. domingensis* presenta alta tolerancia a las condiciones a las que fue expuesta. De acuerdo a estos resultados se propone realizar un nuevo experimento determinando la tolerancia exponiendo a *T. domingensis* a altas concentraciones de los tres metales. Se aprovechará esta experiencia para estudiar la dinámica de acumulación de Cr, Ni y Zn en los distintos tejidos y la tolerancia a dichos contaminantes. Para esto se expondrá a *T. domingensis* a altas concentraciones de metales agregados en forma combinada y las distribuciones de los mismos a lo largo del tiempo en los distintos compartimentos del sistema agua-planta-sedimento.

2.3. Experiencia N° 2: Estudio de la distribución de Cr, Ni y Zn en tejidos de *T. domingensis* a lo largo del tiempo

2.3.1. Objetivo:

Estudiar la tolerancia y las respuestas morfológicas de *T. domingensis* a una solución combinada de altas concentraciones de Cr (III) + Ni (II) + Zn (II) y determinar la distribución a lo largo del tiempo en agua, raíz, hojas.

2.3.2. Metodología:

Diseño experimental:

Se recolectaron plantas en un ambiente natural ubicado en la cercanía de la localidad de Arroyo Leyes, Santa Fe, perteneciente a la llanura de inundación del Paraná medio (Sitio 2, S 31° 33'52,69'', O 60° 37' 7,51'') y se plantaron sus rizomas en contenedores plásticos conteniendo 4 kilos de sedimento. Los tratamientos fueron dispuestos por duplicado. Cuando las plantas alcanzaron una altura de aproximadamente 20 cm a cada acuario se le agregó 5 L de una solución combinada de 100 mg L⁻¹ Cr + 100 mg L⁻¹ Ni + 100 mg L⁻¹ Zn, preparada con agua del sitio de muestreo. Cada muestreo consistió en la extracción de agua, sedimento y plantas para su análisis, por lo tanto cada reactor era desechado en cada muestreo. Se utilizaron tantos acuarios como muestreos se realizaron. El esquema de los muestreos fue el siguiente:

- Muestreo 1: 2 hs.
- Muestreo 2: 8 hs.
- Muestreo 3: 24 hs.
- Muestreo 4: 48 hs.
- Muestreo 5: 14 días
- Muestreo 6: 7 días
- Muestreo 7: 10 días
- Muestreo 8: 15 días
- Muestreo 9: 28 días

- Muestreo 10: 60 días
- Muestreo 11: 90 días

El experimento tuvo una duración de 90 días y se utilizó un contenedor control que solo se analizó al finalizar la experiencia. El nivel de agua de los acuarios se mantuvo mediante el agregado de agua del sitio de muestreo.

Estudio de la vegetación:

En cada muestreo realizado, se midió la altura de plantas, la concentración de clorofila (la cual fue expresado como porcentaje de aumento de clorofila) y de metales en agua, tejidos (hojas, raíces y rizomas) y sedimento. Se calcularon las tasas de crecimiento relativo en base a la altura de plantas, los factores de translocación (concentración en hojas/concentración en raíces) y bioacumulación de metales (concentración en raíces/concentración en sedimento). Al finalizar la experiencia se analizaron en microscopio óptico 30 secciones transversales de raíces en el muestreo final (90 días) y en el control, midiendo el área transversal de las raíces (ATR), de la médula (ATM), de los vasos metaxilemáticos (ATV) y contabilizando el número de vasos (NV). Los tejidos fueron analizados también por microscopía electrónica de barrido (MEB).

Análisis químico:

Se efectuó una caracterización físico-química en el agua y sedimento del sitio de muestreo donde se recolectaron las plantas para la realización del experimento (sitio 2).

Para caracterizar el agua del sitio de muestreo se siguieron las técnicas explicadas en la sección de materiales y métodos. Las concentraciones de Cr, Ni y Zn se determinaron en cada muestreo en plantas (raíz, rizoma y hojas), agua y sedimento.

Análisis Estadístico:

Se realizaron análisis de la varianza de una vía para determinar si existieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados para las tasas de crecimiento relativo y para el porcentaje de aumento de clorofila. Para determinar si existieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados para las

concentraciones de metales en tejidos vegetales, se realizaron análisis de la varianza de dos factores (tiempo de muestreo y órganos vegetativos). Debido a que los parámetros de la morfología interna de raíces no presentaron una distribución normal, se aplicó el análisis de Kruskal-Wallis para testear las diferencias entre los tratamientos. Cuando se presentaron diferencias estadísticamente significativas, el test de Wilcoxon se utilizó para comparar los tratamientos entre sí.

2.3.3. Resultados:

Las Tablas 2.5 y 2.6 muestran la caracterización físico-química del agua y sedimento, respectivamente, del sitio de muestreo donde se recolectaron las plantas para la realización del experimento.

Tabla 2.5. Caracterización físico química del agua del sitio de muestreo (Sitio 2) (ND=no detectado, LD=límite de detección).

Parámetros	WN
pH	7,31
Conductividad ($\mu\text{mho cm}^{-1}$)	210
Sólidos Totales (mg L^{-1})	139,2
Alcalinidad (CaCO_3) (mg L^{-1})	103,2
HCO_3^- (mg L^{-1})	138,1
CO_3^{2-} (mg L^{-1})	ND
Cl^- (mg L^{-1})	9,6
SO_4^{2-} (mg L^{-1})	7,2
Dureza Total (CaCO_3) (mg L^{-1})	34,6
Ca^{2+} (mg L^{-1})	9,7
Mg^{2+} (mg L^{-1})	2,5
Na^+ (mg L^{-1})	32,1
K^+ (mg L^{-1})	12,1
Fe (mg L^{-1})	0,392
Cr (mg L^{-1})	ND (LD=0.005)
Ni (mg L^{-1})	ND (LD=0.005)
Zn (mg L^{-1})	ND (LD=0.005)
PRS (mg L^{-1})	0,015
PT (mg L^{-1})	0,060
NO_2^- (mg L^{-1})	ND (LD= 0.005)
NO_3^- (mg L^{-1})	0,58
NH_4^+ (mg L^{-1})	2,27
DBO (mg L^{-1})	2,5
DQO (mg L^{-1})	5,6
OD (mg L^{-1})	6,72

Tabla 2.6 Caracterización química de los sedimentos comerciales (SC) y del wetland natural (WN) y vegetales (raíz, hoja y rizoma) del sitio de recolección (Sitio2).

Parámetros	SC	WN	Raíz	Rizoma	Hoja
Cr (mg g ⁻¹)	0,015	ND	0,008	0,009	ND
Ni (mg g ⁻¹)	0,006	ND	0,054	0,033	0,022
Zn (mg g ⁻¹)	0,132	ND	0,020	0,026	0,020
PT (mg g ⁻¹)	0,512	0,119	0,784	0,532	1,961

La concentración de metales en agua disminuyó luego de 90 días de experiencia hasta alcanzar porcentajes finales de remoción de 99,9%, 99,04% y 99,5% de Cr, Ni y Zn, respectivamente. Durante los primeros días de experimentación, el Cr fue removido en mayor proporción que los otros metales, alcanzando en el día 14 una remoción de 98,2%, mientras que el Zn mostró una remoción de 58% y el Ni 27,2% (Fig. 2.8).

En cuanto a la acumulación de los metales en el sedimento, el Ni y el Zn aumentaron su concentración a lo largo del tiempo alcanzando un valor máximo en el día 28, pero disminuyeron en los últimos dos muestreos. Las concentraciones de Cr fueron significativamente menores que las de los otros metales en todos los muestreos. Las concentraciones finales de Zn y Ni en sedimento al final de la experiencia fueron significativamente superiores que la del Cr (Fig. 2.9).

En cuanto a los tejidos, la parte aérea acumuló concentraciones de metales iguales o mayores a las raíces (Fig. 2.10). La figura 2.11 Muestra lo balances de masas de metales considerando sus contenidos en agua, raíces y hojas. Este contenido (expresado en mg) se calculó multiplicando la concentración en el compartimiento (mg g⁻¹ ó mg L⁻¹) por la masa (g de peso seco) o volumen del mismo (L). En los balances de masa se observa que a lo largo del tiempo el contenido de metales en agua disminuye al mismo tiempo que aumenta en raíces y hojas, mientras que el rizoma no mostró aumentos ya que actuó como un órgano de transporte de los metales (Fig. 2.11). El sedimento fue el compartimiento que mostró el mayor contenido de metales. En el día 14 se observó un aumento significativo del contenido de los tres metales en el sedimento, manteniendo valores similares hasta el final del experimento.

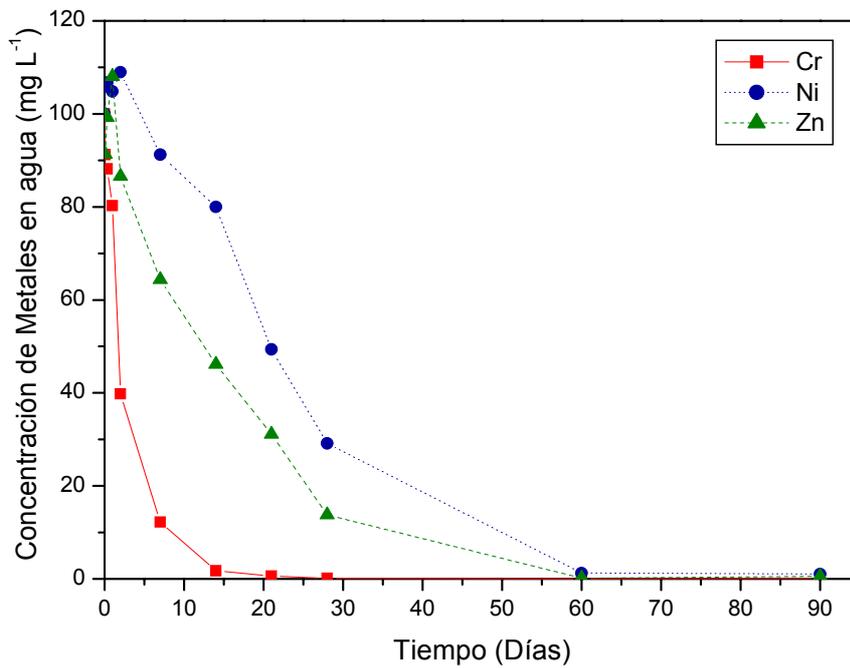


Fig. 2.8. Concentración de metales (Cr, Ni y Zn) en agua (mg L^{-1}) obtenida a lo largo del tiempo (Días).

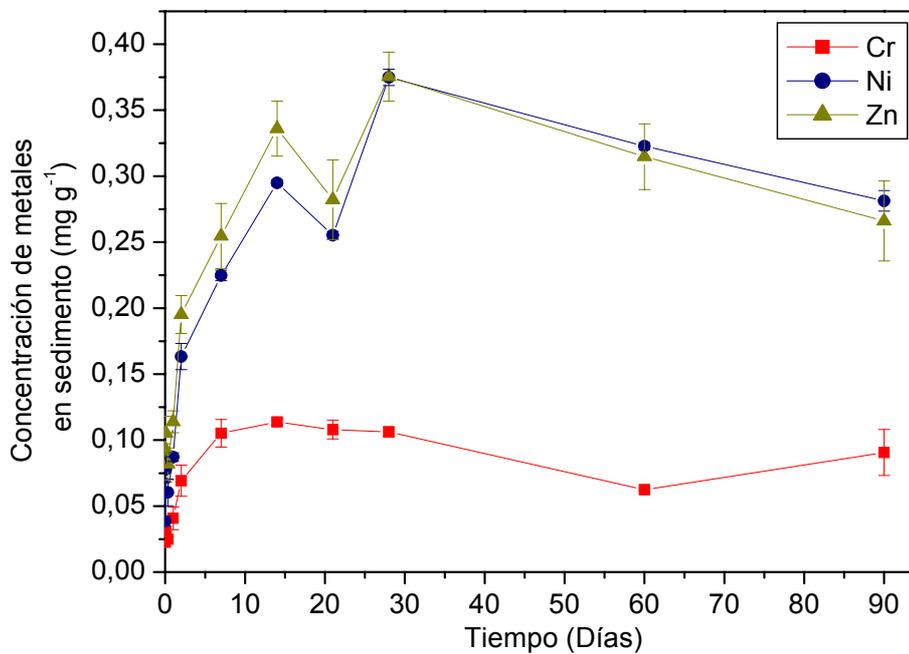


Fig. 2.9. Concentración de metales Cr, Ni y Zn (mg g^{-1}) en sedimento obtenida a lo largo del tiempo (Días).

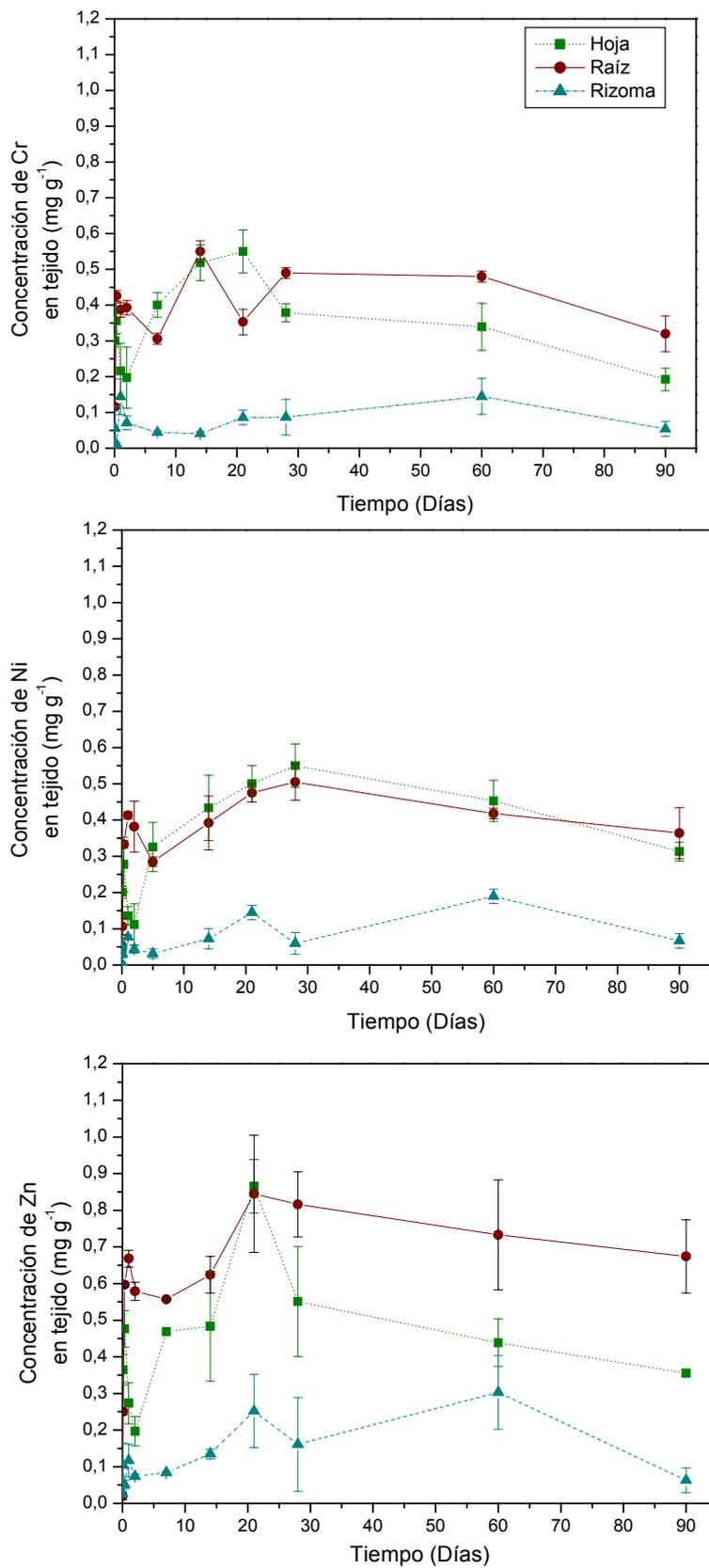


Fig. 2.10. Concentración de Cr, Ni y Zn (mg g⁻¹) en tejidos (hoja, raíz y rizoma) de *T. domingensis*. a lo largo del tiempo (días).

Tabla. 2.7. Factores de Translocación (Concentración de metales en hojas/ concentración de metales en raíces) calculados en cada muestreo.

Muestreos	Cr	Ni	Zn
0	1,092	0,788	1,004
2hs	0,984	0,882	1,056
8hs	0,835	0,834	0,798
24hs	0,559	0,329	0,410
48hs	0,502	0,294	0,340
7 días	1,311	1,145	0,842
14 días	1,143	1,107	0,775
21 días	1,554	1,064	1,025
28 días	0,773	1,090	0,675
60 días	0,707	1,083	0,598
90 días	0,602	0,861	0,527

Tabla 2.8. Factores de Bioacumulación (Concentración en raíces/concentración en sedimentos) calculados en cada muestreo.

Muestreos	Cr	Ni	Zn
0	0,36	0,41	0,22
2 hs	3,771	1,37	2,38
8 hs	5,12	2,51	3,28
24 hs	9,49	4,75	5,86
48 hs	5,68	2,34	2,96
7 días	2,90	1,27	2,19
14 días	5,56	1,33	1,86
21 días	3,27	1,86	3,00
28 días	4,61	1,35	2,17
60 días	5,68	1,30	2,33
90 días	3,53	1,29	2,53

En las tablas 2.7. y 2.8 se muestran los factores de translocación y de bioacumulación en todos los muestreos. Es importante destacar que los factores de traslocación muestran que la concentración en hojas no mostró diferencias significativas con la de raíces. El Cr fue el metal que presentó los mayores factores de bioacumulación, debido a una menor acumulación en sedimento que los otros metales (Fig. 2.9)

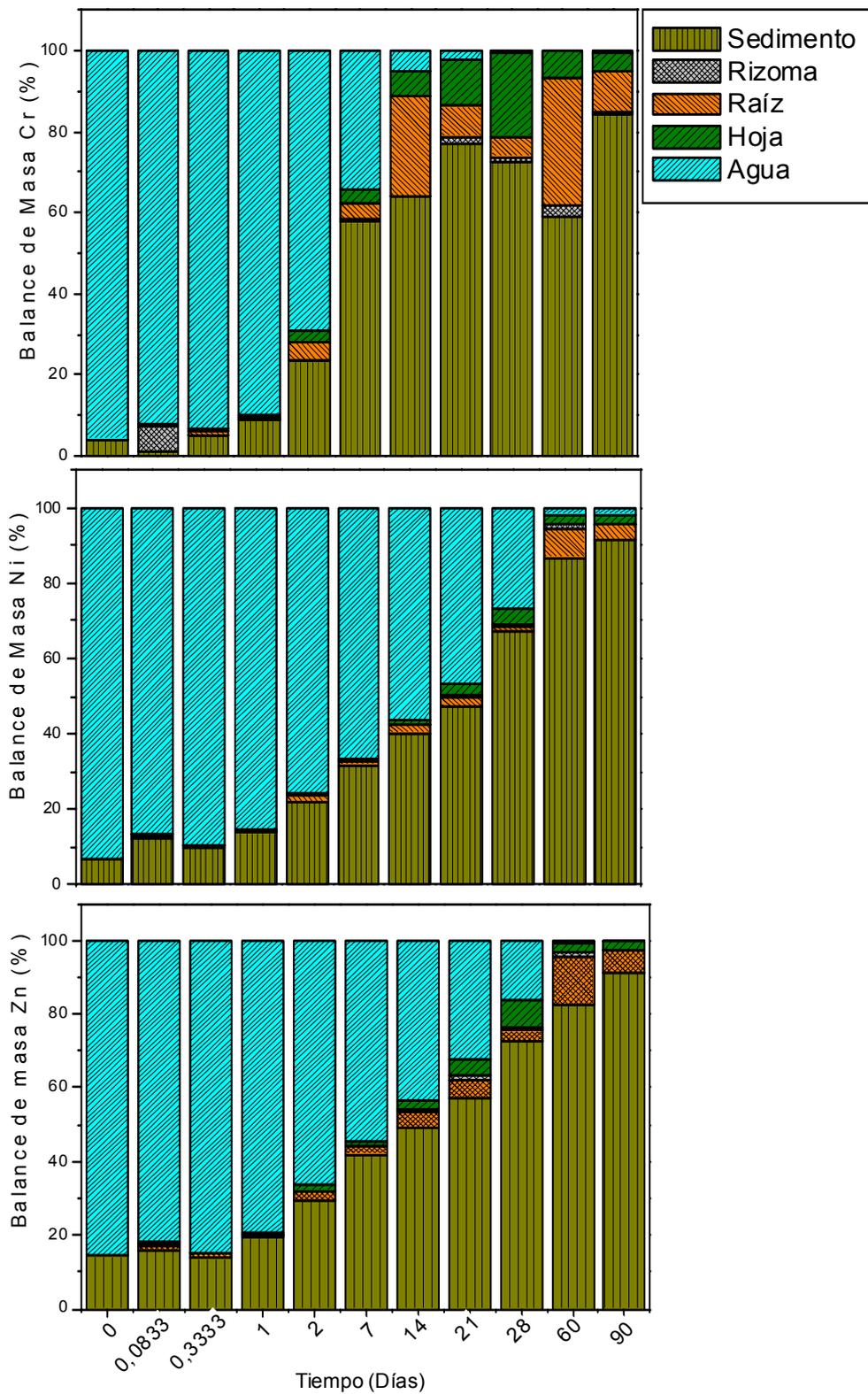


Fig. 2.11. Balance de masas de los contaminantes (Cr, Ni y Zn) (mg g) a lo largo del tiempo en los distintos compartimentos (agua, raíz, rizoma, hoja y sedimento).

La altura de plantas aumentó durante toda la experiencia resultando en tasas de crecimiento relativo positivas (Fig. 2.12a). En las tasas de crecimiento relativo no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los primeros muestreos (2 hs- 48 hs), pero posteriormente dichas tasas aumentaron sostenidamente hasta el final de la experiencia. Si bien las tasas de crecimiento relativo fueron positivas, fueron significativamente menores que las del control, lo cual demuestra una inhibición en el crecimiento. En cuanto a la concentración de clorofila se observó una disminución de dicho pigmento en todos los muestreos, excepto a los 14 y 21 días, demostrando que las plantas no toleraron la mezcla de elevada concentraciones de metales (Fig. 2.12b).

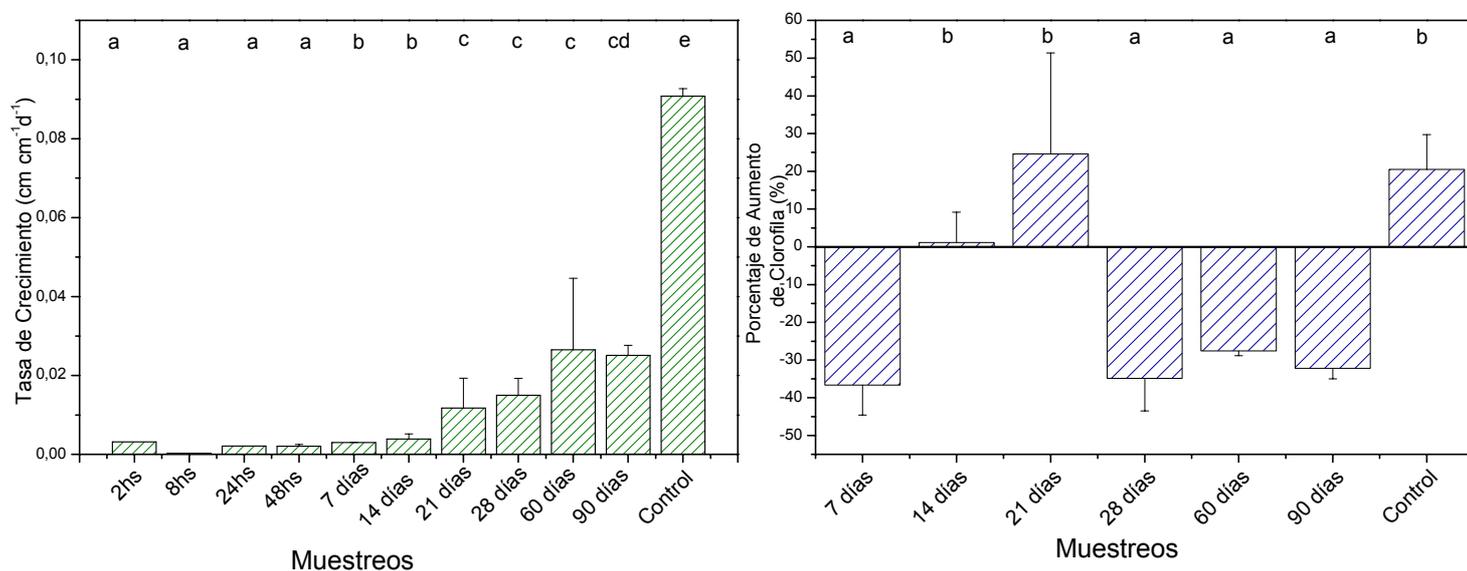


Fig. 2.12. Tasas de crecimiento relativo (a) (R) ($\text{cm cm}^{-1} \text{d}^{-1}$) y porcentaje de aumento de clorofila (b) (%) de *T. domingensis*. en cada muestreo. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Los parámetros morfométricos internos de las raíces disminuyeron significativamente con respecto al control, excepto el ATV (Fig. 2.13). En los análisis de MO (Fig. 2.14) y MEB (Fig. 2.15) se puede observar el estado de los tejidos al finalizar la experiencia.

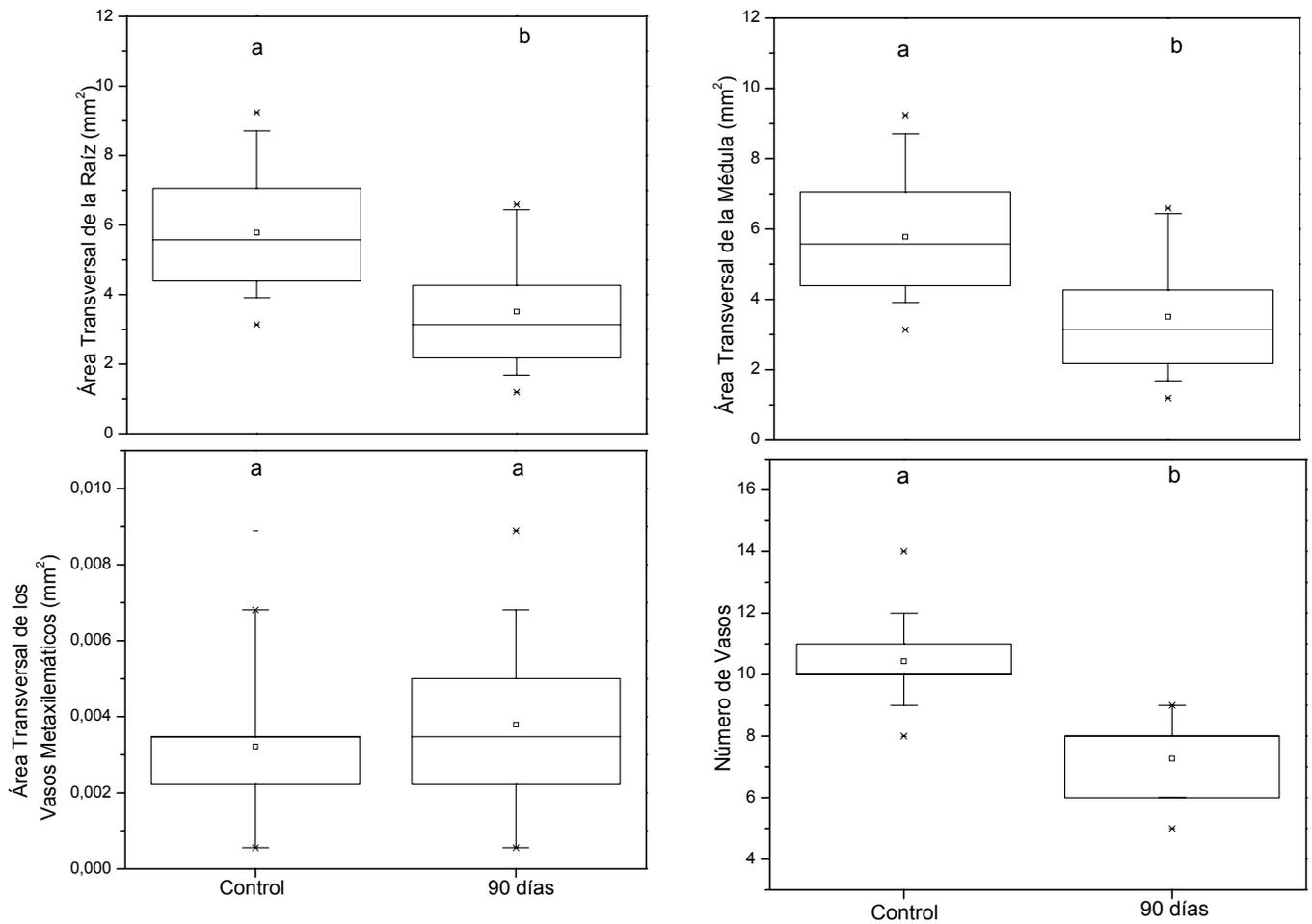


Fig. 2.13. Parámetros morfométricos internos de las raíces (ATR, ATM, ATV y NV) de los muestreos a los 90 días y del control. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

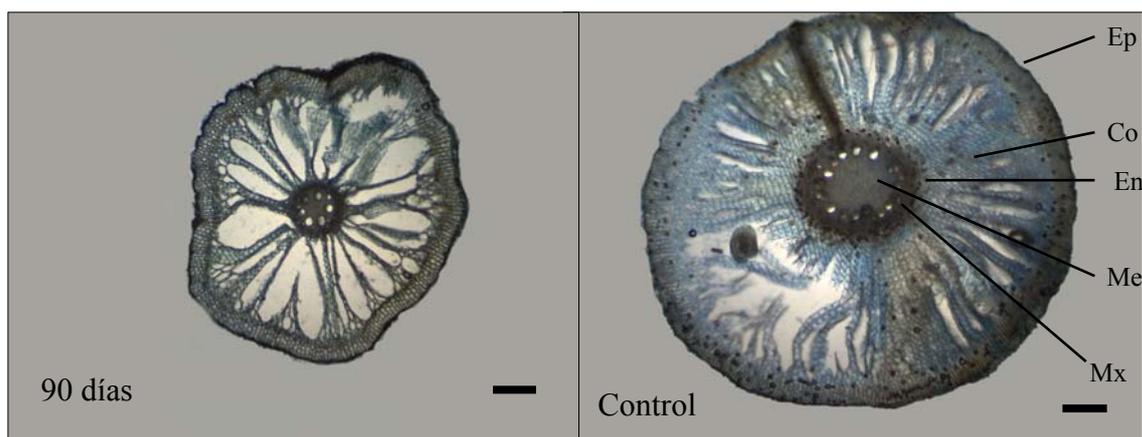


Fig. 2.14. Imágenes de microscopía óptica de las secciones transversales de raíces de *T. domingensis* sometida a tratamientos de Cr, Ni, Zn a los 90 días y el tratamiento control. Ep= epidermis, Co= cortex, En= endodermis, Me= médula y Mx= vasos metaxilemáticos. Barra= 650 μm.

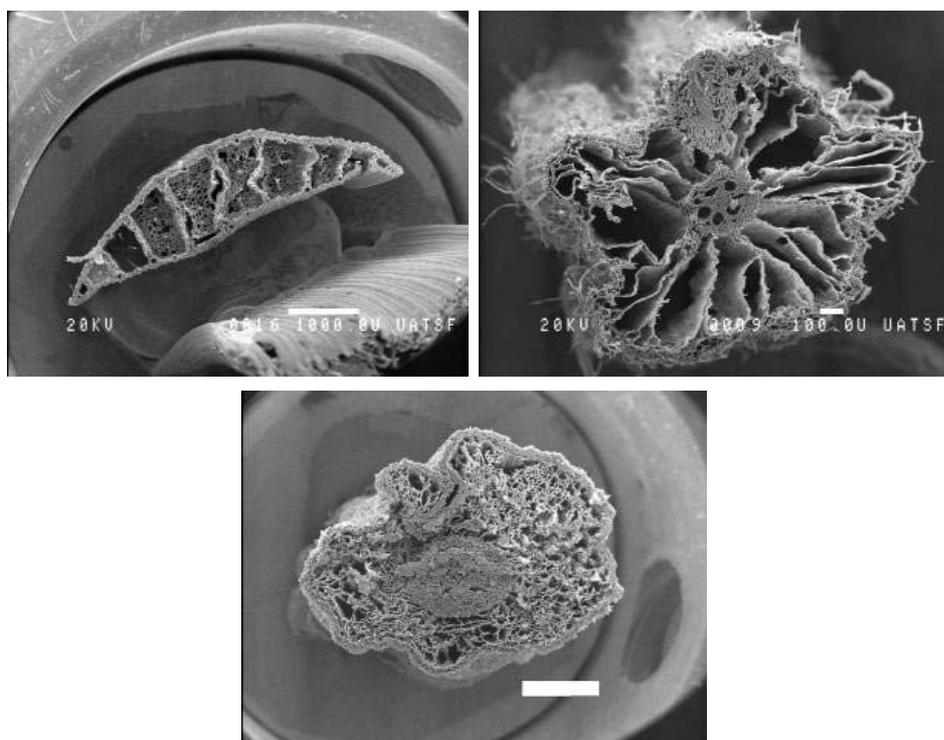


Fig. 2.15. Imágenes de los cortes trasversales de tejidos (hoja, raíz y rizoma) obtenidos a los 90 días bajo SEM-EDAX con energía 20kV en plantas de *T. domingensis*.

2.3.4. Consideraciones finales:

Las raíces responden a la toxicidad de los metales disminuyendo sus áreas transversales y su número de vasos, aumentando estos últimos su área. Esto no pudo observarse en la experiencia anterior debido a que las concentraciones de metales eran muy bajas en comparación con las de esta experiencia.

Las hojas presentaron concentraciones iguales o mayores a las raíces. Este dato no coincide con la bibliografía y con los resultados obtenidos hasta el momento por nuestro grupo de trabajo. Pudimos observar que esto sucedió solo cuando *T. domingensis* fue sometida a altas concentraciones de metales. Podemos hipotetizar que la rápida translocación de los metales a las partes aéreas fue debido a que al podarse las plantas se activa la fisiología de dicha especie translocando los metales a estos órganos.

Recordemos, que al comenzar la experiencia las plantas fueron podadas a una altura de 20 cm, a partir de ese momento se observó que la altura de plantas aumentó rápidamente alcanzando en apenas 10 minutos de haber sido podada la planta, un crecimiento de 2 cm. Otra hipótesis que podría plantearse es que las altas concentraciones en hojas se debieron a que la parte inferior de las hojas estuvieron sumergidas en la solución, sorbiendo los metales por contacto directo

Para responder estos interrogantes, se decidió realizar otro experimento para poder observar con más detalles cuales eran los procesos de entrada y acumulación de los metales en plantas de *T. domingensis*, por lo cual se seccionó a las hojas en una parte aérea y en otra parte sumergida, la cual se encuentra en contacto directo con la solución experimental.

Como las concentraciones estudiadas son extremadamente mayores que las que se encuentran habitualmente tanto en humedales naturales como contruidos para tratamiento de efluentes, los resultados obtenidos demostrarían la capacidad de *T. domingensis* para sobrevivir ante un accidental volcado de altas concentraciones de estos metales a un sistema acuático.

Debido a que las plantas no murieron al ser expuestas a la combinación de $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr} + 100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni} + 100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}$, se propuso realizar una siguiente experiencia utilizando mayores concentraciones de metales en forma separada y en soluciones de metales combinados, además de estudiar al P (nutriente presente habitualmente en humedales contruidos para el tratamiento de efluentes industriales y en humedales naturales) para estudiar no solo la dinámica de los metales y el P dentro del sistema, sino también analizar el comportamiento y la acumulación de los metales en presencia de este nutriente.

2.4. Experiencia N° 3: Estudio de la respuesta de *T. domingensis* a altas concentraciones de metales y P

2.4.1. Objetivo:

De acuerdo con los resultados obtenidos en la experiencia anterior, se realizó esta experiencia con el objetivo de estudiar la tolerancia y los cambios morfológicos de *T. domingensis* sometida a altas concentraciones de metales y nutrientes (P), en forma separada y combinada.

2.4.2. Metodología:

Diseño Experimental:

Se realizó una experiencia en invernadero con el fin de observar la tolerancia y los cambios morfológicos de *T. domingensis* cuando es sometida a altas concentraciones de metales y nutrientes agregados en forma conjunta y separada.

Las plantas se recolectaron en un ambiente natural ubicado en la cercanía de la localidad de Arroyo Leyes, Santa Fe (Sitio 2, 31° 32' 45" S; 60° 29' 37" O). Se colocaron dos plantas en cada acuario y luego se aclimataron en invernadero durante 15 días. Luego, fueron podadas a una altura de aproximadamente 20 cm y se agregaron soluciones de metales y nutrientes según los siguientes tratamientos:

- 1) 100 mg L⁻¹ P (P100)
- 2) 500 mg L⁻¹ P (P500)
- 3) 100 mg L⁻¹ Cr (Cr100)
- 4) 500 mg L⁻¹ Cr (Cr500)
- 5) 100 mg L⁻¹ Ni (Ni100)
- 6) 500 mg L⁻¹ Ni (Ni500)
- 7) 100 mg L⁻¹ Zn (Zn100)
- 8) 500 mg L⁻¹ Zn (Zn500)
- 9) 500 mg L⁻¹ Cr + 500 mg L⁻¹ Ni + 500 mg L⁻¹ Zn (Comb500)
- 10) Control, sin el agregado de metales

El nivel de agua de los acuarios se mantuvo mediante el agregado de agua del sitio de muestreo.

Estudio de la vegetación:

Periódicamente, se midió la altura de plantas, y al inicio y al final de la experiencia se midió la concentración de clorofila (la cual fue expresada como porcentaje de aumento de clorofila). Se calcularon las tasas de crecimiento relativo en base a la altura de plantas, los factores de translocación (concentración en hojas/concentración en raíces) y bioacumulación de metales (concentración en raíces/concentración en sedimento). Al finalizar la experiencia se analizaron en microscopio óptico 30 secciones transversales de raíces de cada contenedor, midiendo el área transversal de las raíces (ATR), de la médula (ATM), de los vasos metaxilemáticos (ATV) y contabilizando el número de vasos (NV). Los tejidos fueron analizados también por microscopía electrónica de barrido (MEB). En esta experiencia se dividió la planta en distintas zonas con el fin de poder observar en que lugar se produce la sorción y consecuente translocación de los metales en las plantas

Análisis químico:

Se efectuó una caracterización físico-química en el agua del sitio de muestreo donde se recolectaron las plantas para la realización del experimento. Para caracterizar el agua del sitio de muestreo se siguieron las técnicas explicadas en la sección de materiales y métodos. Se muestreó el agua sobrenadante a los 0, 2, 4, 7, 14 y 28 días, tiempo que duró la experiencia.

Al inicio y a los 28 días se determinó la concentración de los contaminantes en sedimento y en plantas, las cuales fueron separadas en raíz, rizoma, hojas aéreas sumergidas y hojas aéreas.

Análisis Estadístico:

Se realizaron análisis de la varianza de una vía para determinar si existieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados para las tasas de crecimiento relativo y para el porcentaje de aumento de clorofila. Para determinar si

existieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados para las concentraciones de metales en tejidos vegetales, se realizaron análisis de la varianza de dos vías (tratamientos y órganos vegetativos). Debido a que los parámetros de la morfología interna de raíces no presentaron una distribución normal, se aplicó el análisis de Kruskal-Wallis para testear las diferencias entre los tratamientos. Cuando se presentaron diferencias estadísticamente significativas, el test de Wilcoxon se utilizó para comparar los tratamientos entre sí.

2.4.3. Resultados:

Las Tablas 2.9 y 2.10 muestran la caracterización físico-química del agua y sedimento del sitio de muestreo donde se recolectaron las plantas para la realización del experimento.

Tabla 2.9. Caracterización físico química del agua del sitio de muestreo (Sitio 2) (ND=no detectado, LD=límite de detección).

Parámetros	WN
pH	8,0
Conductividad ($\mu\text{mho cm}^{-1}$)	223
Solidos Totales (mg L^{-1})	152,4
Alcalinidad (CaCO_3) (mg L^{-1})	104,2
HCO_3^- (mg L^{-1})	128,1
CO_3^{2-} (mg L^{-1})	ND
Cl^- (mg L^{-1})	14,6
SO_4^{2-} (mg L^{-1})	10,5
Dureza Total (CaCO_3) (mg L^{-1})	33,6
Ca^{2+} (mg L^{-1})	9,8
Mg^{2+} (mg L^{-1})	2,2
Na^+ (mg L^{-1})	36,8
K^+ (mg L^{-1})	16,1
Fe (mg L^{-1})	0,29
Cr (mg L^{-1})	N D (LD=0.005)
Ni (mg L^{-1})	ND (LD=0.005)
Zn (mg L^{-1})	ND (LD=0.005)
PRS (mg L^{-1})	0,023
PT (mg L^{-1})	0,076
NO_2^- (mg L^{-1})	ND (LD= 0.005)
NO_3^- (mg L^{-1})	0,41
NH_4^+ (mg L^{-1})	1,99
DBO (mg L^{-1})	3,6
DQO (mg L^{-1})	6,4
OD (mg L^{-1})	6,71

Tabla 2.10. Caracterización química de los sedimentos comerciales (SC) y del wetland natural (WN) y vegetales (raíz, hoja y rizoma) del sitio de recolección (Sitio2).

Parámetros	SC	WN	Raíz	Rizoma	Hoja
Cr (mg g ⁻¹)	0,015	ND	0,008	0,005	0,004
Ni (mg g ⁻¹)	0,006	ND	ND	ND	ND
Zn (mg g ⁻¹)	0,132	ND	0,071	0,030	0,049
PT (mg g ⁻¹)	0,512	0,119	0,781	0,533	1,984

La concentración de contaminantes en agua disminuyó durante todos los muestreos (Fig. 2.16). A lo largo del experimento, las concentraciones de Cr en agua en el tratamiento Comb500 fueron significativamente menores que las obtenidas en el tratamiento Cr500. En el caso del Ni, no se registraron diferencias significativas entre las concentraciones de este metal en agua para los tratamientos Ni500 y Comb500. Las concentraciones de Zn en agua en el tratamiento Comb500 fueron significativamente superiores que las de Zn500 a lo largo del todo el experimento. El Zn en el tratamiento de Zn100 mostró una remoción más lenta que los otros metales y, por su parte, el P mostró una menor eficiencia de remoción en comparación con las obtenidas en los metales (Fig. 2.16).

En cuanto a las concentraciones de Cr en tejidos, pudo observarse que en el tratamiento Cr100 la parte sumergida de hojas mostró la mayor concentración de este metal, mientras que en el tratamiento Cr500, la raíz fue el órgano que mostró la mayor concentración del metal, seguido de la parte sumergida de las hojas, este mismo resultado fue observado en el tratamiento Comb500 (Fig. 2.17). La concentración de Ni registrada en las partes sumergidas de hojas fue la más alta en los tratamientos Ni100 y Ni500, mientras que en el tratamiento Comb500 no existieron diferencias significativas entre las concentraciones de Ni de los diferentes compartimientos. El Zn mostró las mayores concentraciones en la parte sumergida de hojas en comparación con las registradas para el Cr y Ni. Respecto del P, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de los diferentes órganos en el tratamiento P100. La concentración de P en sedimento, fue significativamente menor que en los tejidos.

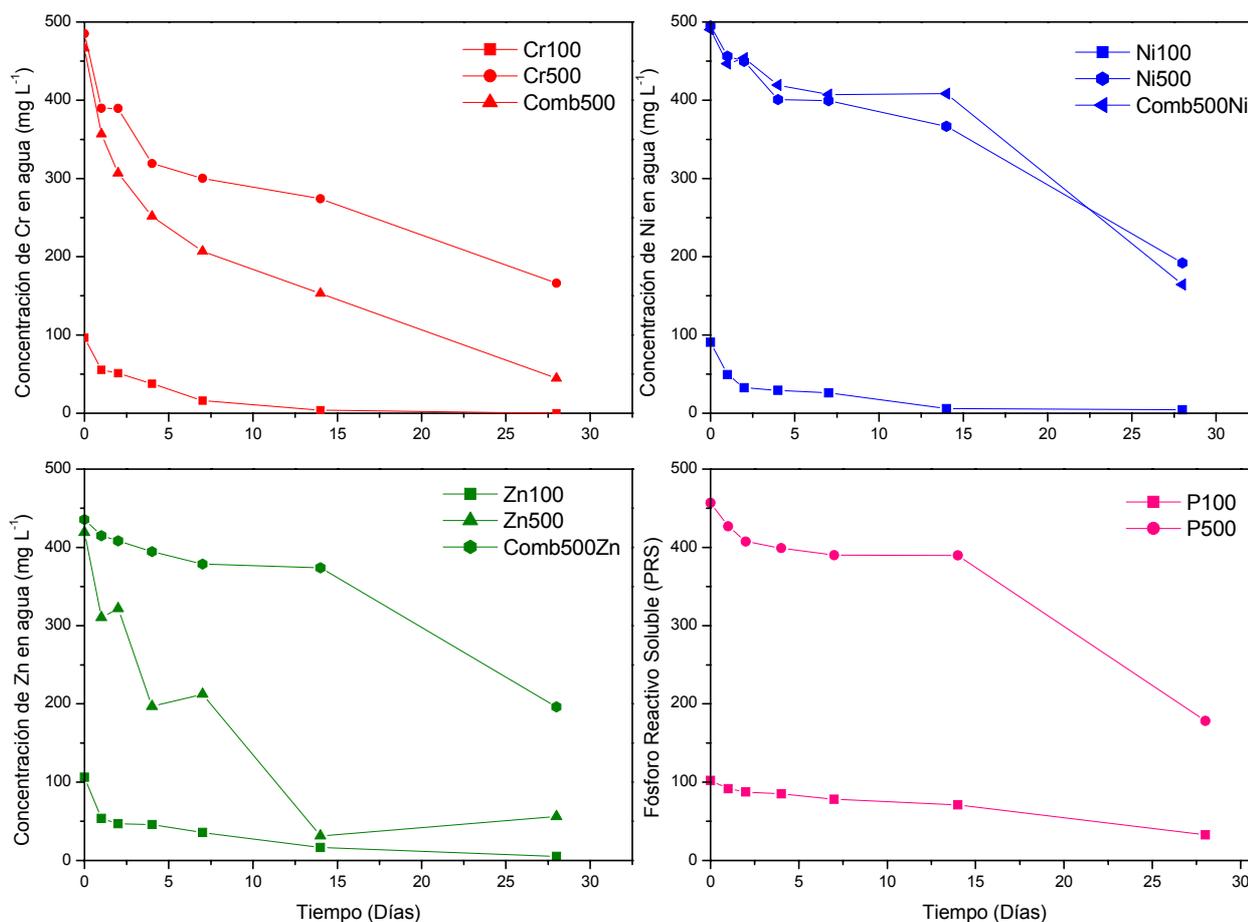


Fig. 2.16. Concentraciones de contaminantes (Cr, Ni y Zn) y P en agua (mg L^{-1}) a lo largo del tiempo (días).

Pudo observarse que en P100 la concentración en sedimento fue significativamente menor que en P500. Las concentraciones de metales en el sedimento no mostraron diferencias significativas entre los metales. El sedimento mostró un aumento en la concentración de los tres metales en los tratamientos Cr500, Ni500 y Zn500, no encontrándose diferencias significativas con las concentraciones en los tratamientos de metales combinados. En el tratamiento P500, se observó un aumento significativo en las concentraciones de P en todos los órganos vegetales, siendo la parte sumergida de las hojas el tejido que mostró la mayor concentración. En comparación con los metales, el P mostró mayores concentraciones en tejidos al final del experimento. En cuanto a la concentración de P en sedimento se observan bajas concentraciones de este. En las Tablas 2.11 y 2.12 se muestran los factores de translocación y de bioacumulación, respectivamente.

Tabla. 2.11. Factores de Translocación (Concentración de metales en partes aéreas de hojas/ concentración de metales en raíces) calculados al final del experimento en cada tratamiento.

Tratamientos	Factor
Cr100	2,339
Cr500	0,421
Cr (Comb500)	0,463
Ni100	1,814
Ni500	0,648
Ni (Comb500)	1,385
Zn100	0,387
Zn500	0,236
Zn (Comb500)	0,659
P100	1,875
P500	0,737

Tabla 2.12. Factores de Bioacumulación (Concentración en raíces/concentración en sedimentos) calculados al final del experimento en cada tratamiento.

Tratamientos	Factor
Cr100	1,611
Cr500	7,062
Cr (Comb500)	4,847
Ni100	0,210
Ni500	0,482
Ni (Comb500)	1,398
Zn100	1,206
Zn500	2,536
Zn (Comb500)	3,045
P100	4,670
P500	6,930

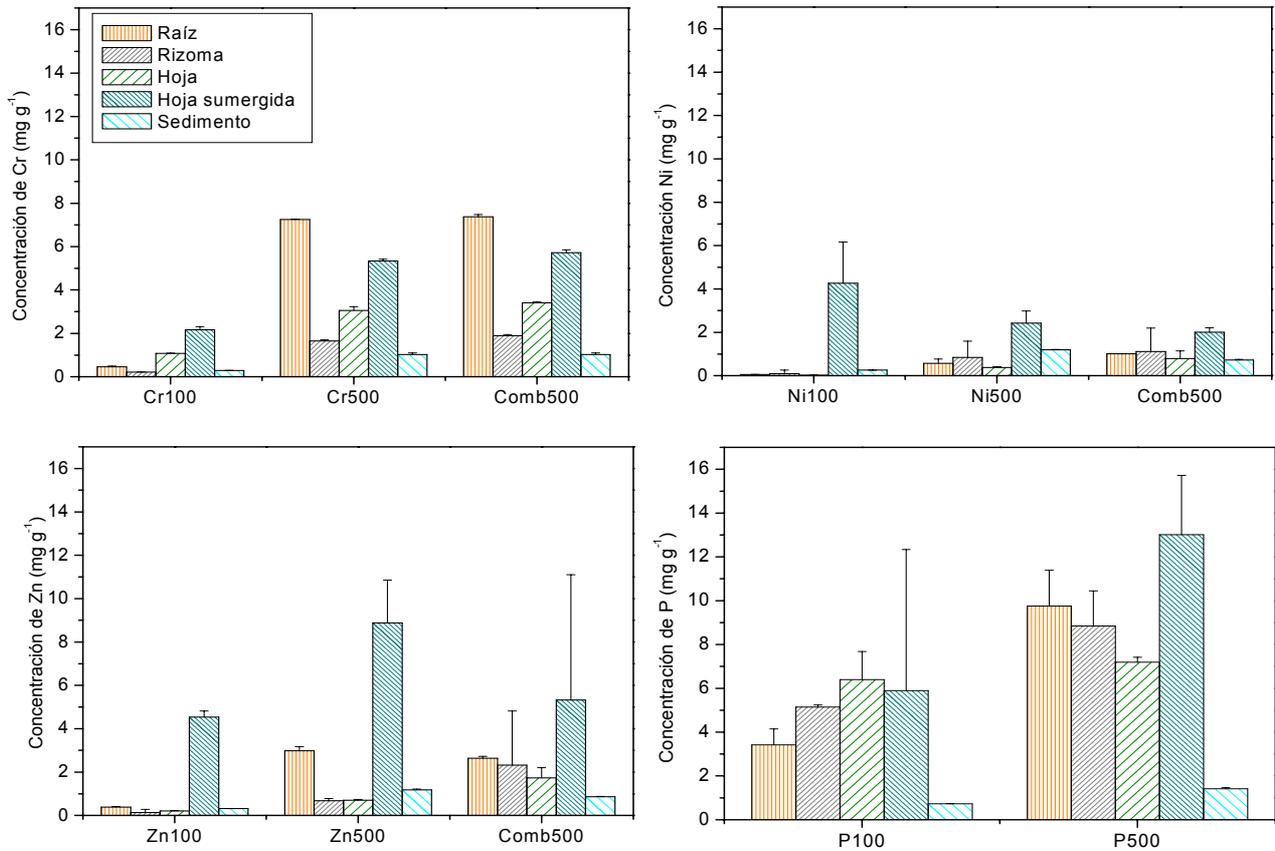


Fig. 2.17. Concentración de contaminantes en tejidos vegetales (parte aérea de hojas, parte sumergida de hojas, raíz y rizoma) y sedimento (mg g^{-1}).

Se realizaron balances de masa para cada tratamiento para determinar en qué medida se acumularon los metales y el P en cada compartimiento (Figs. 2.18a, 2.18b, 2.18c, 2.18d). En los mismos pudo observarse que el sedimento fue el principal compartimiento acumulador de metales y de P y que los tratamientos con el agregado de la mayor concentración y los tratamientos de metales combinados presentaron menores remociones de metales de agua. En los tratamientos de metales combinados se observó que el Cr fue el metal que más se removió del agua acumulándose mayormente en el sedimento.

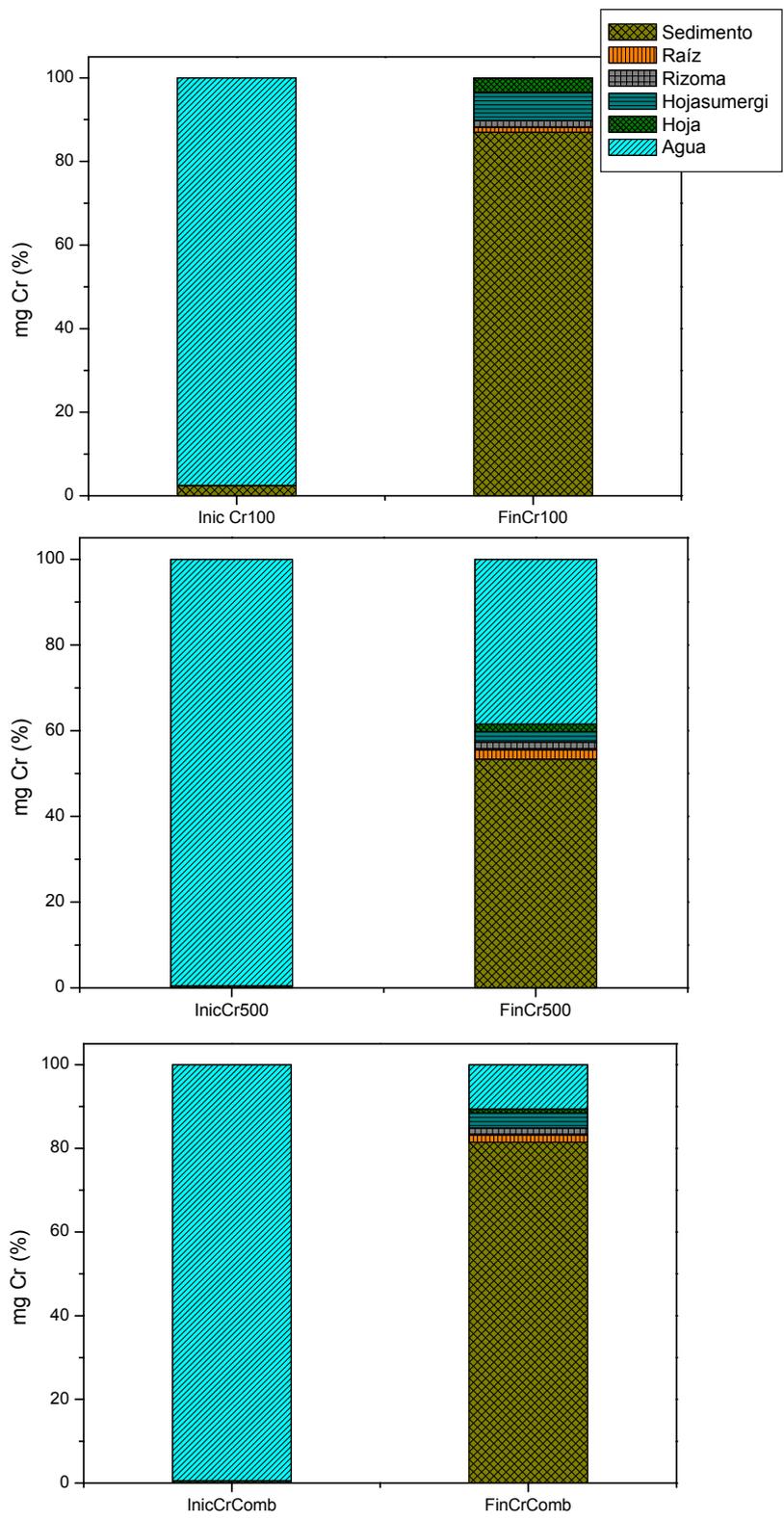


Fig. 2.18a. Balance de Masas de Cr (mg), expresados en porcentajes (%), en los distintos compartimientos analizados (hoja, vástago, raíz, rizoma y sedimento) para los distintos tratamientos.

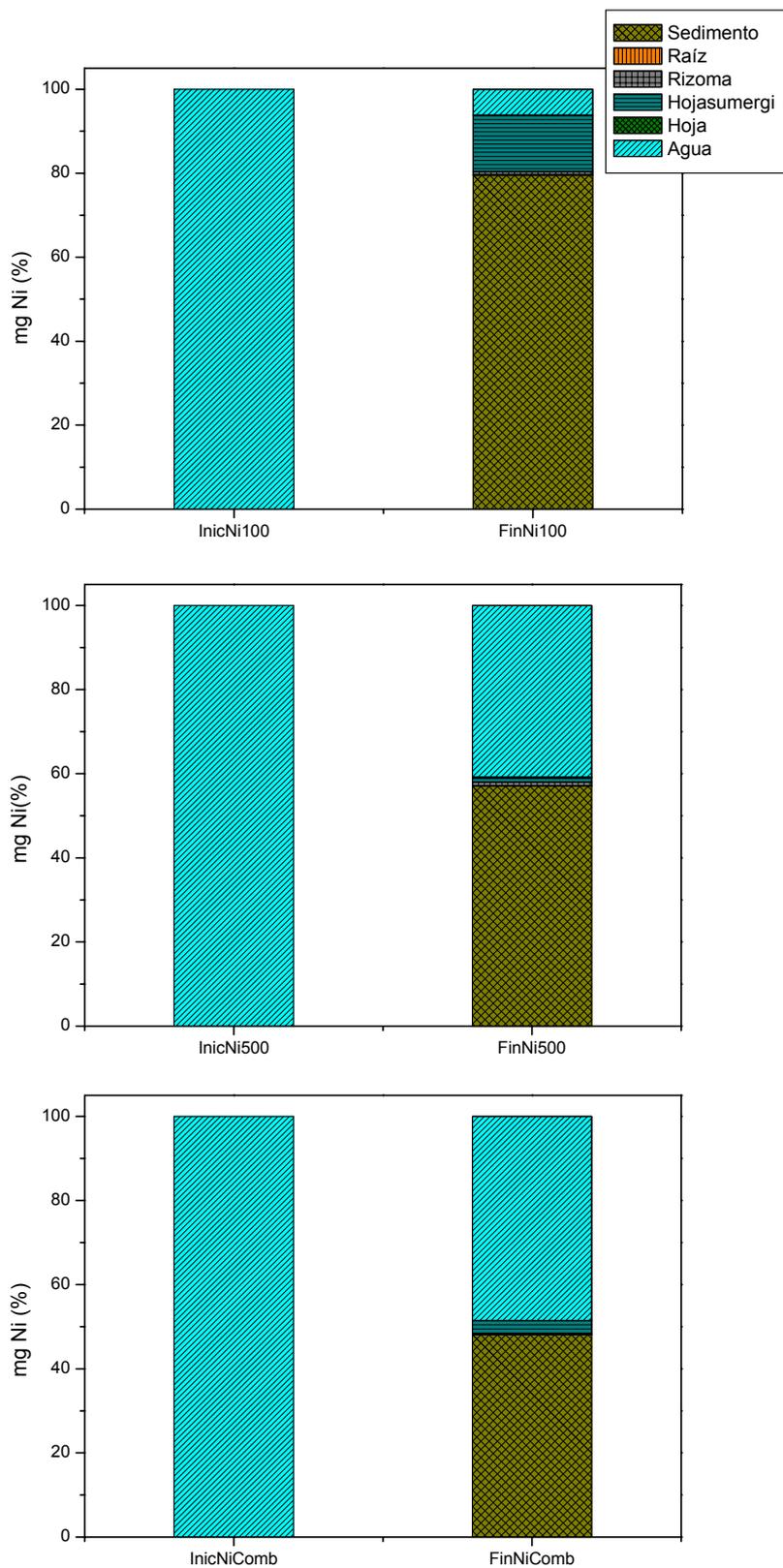


Fig. 2.18b. Balance de Masas de Ni (mg), expresados en porcentajes (%), en los distintos compartimientos analizados (hoja, vástago, raíz, rizoma y sedimento) para los distintos tratamientos.

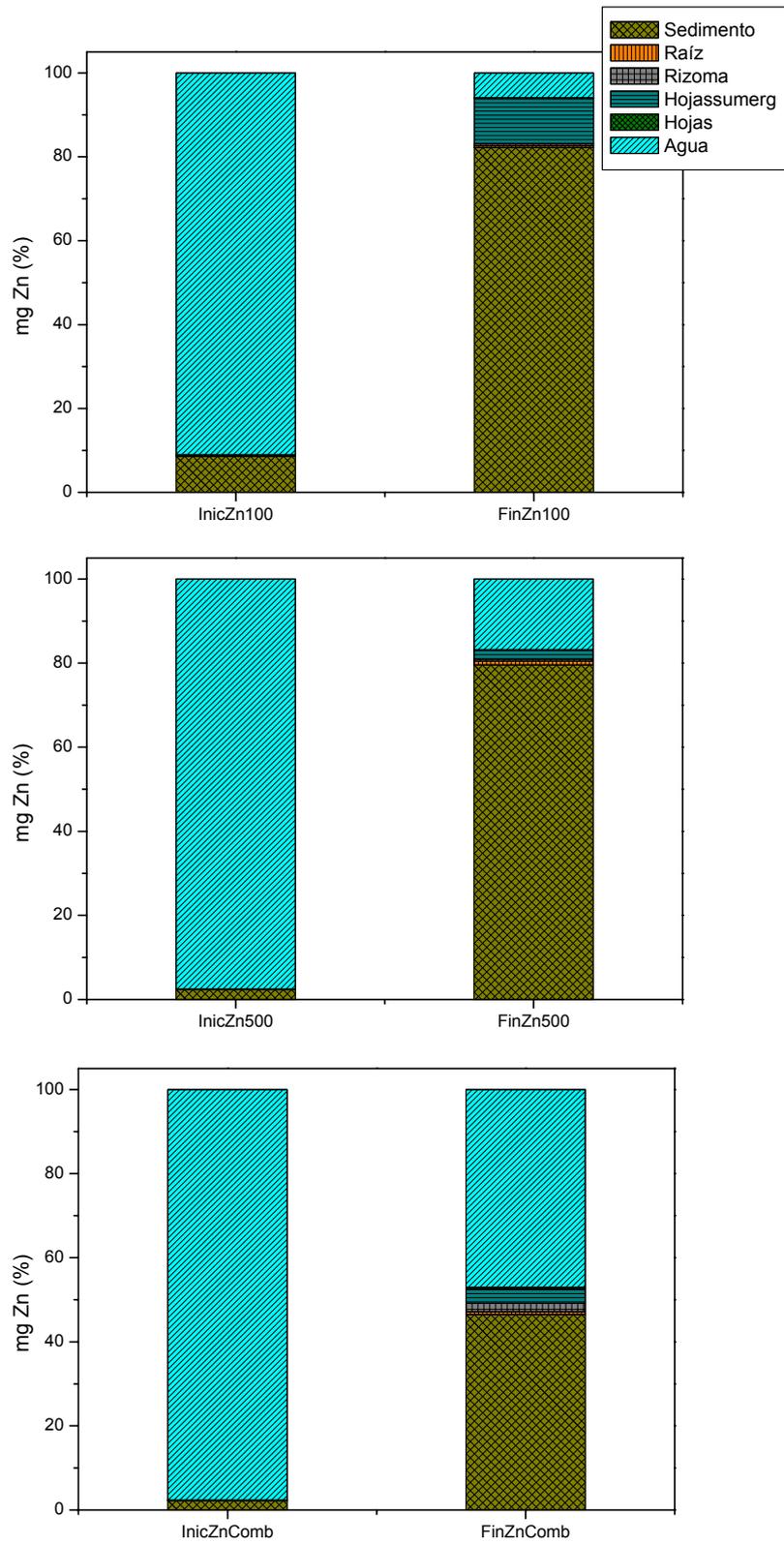


Fig. 2.18c. Balance de Masas de Zn (mg), expresados en porcentajes (%), en los distintos compartimientos analizados (hoja, vástago, raíz, rizoma y sedimento) para los distintos tratamientos.

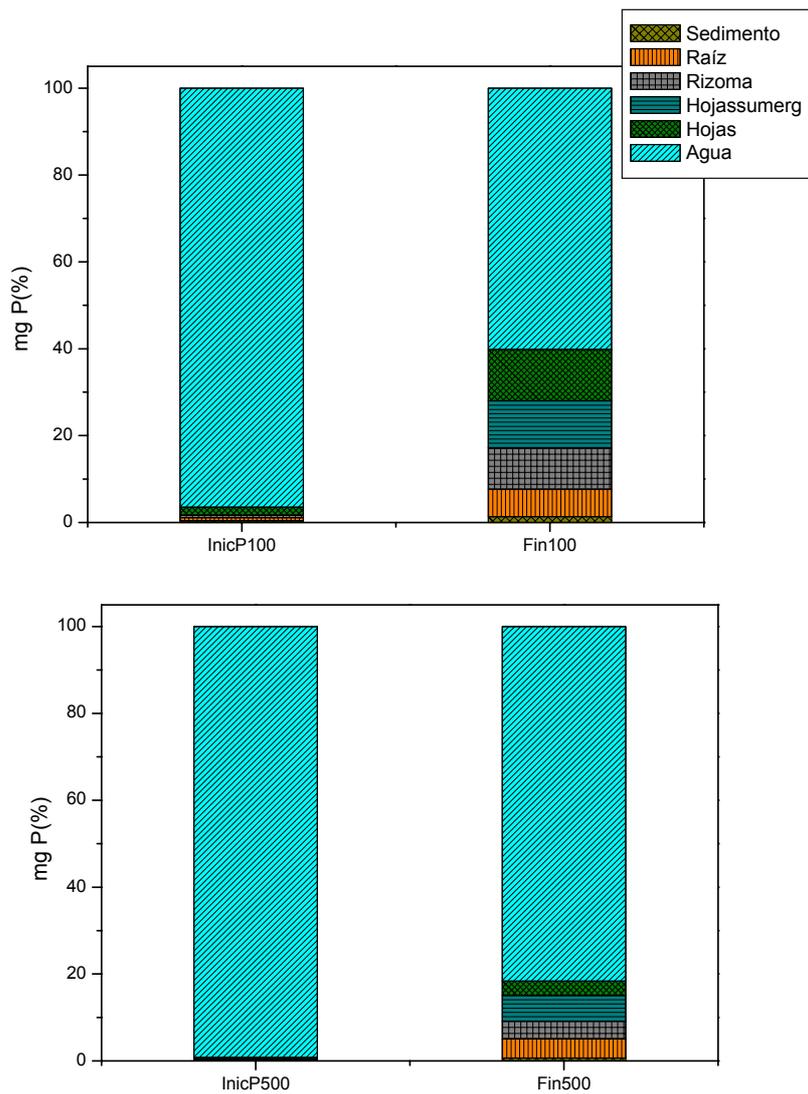


Fig. 2.18d. Balance de Masas de P (mg), expresados en porcentajes (%), en los distintos compartimientos analizados (hoja, vástago, raíz, rizoma y sedimento) para los distintos tratamientos.

Las tasas de crecimiento relativo fueron positivas para los tratamientos de P, Cr y Zn, no existiendo diferencias significativas con el control (Fig. 2.19). El tratamiento de Ni100 mostró una tasa de crecimiento negativa significativamente mayor que las obtenidas en los tratamientos Ni500 y Comb500, demostrando la mayor toxicidad del Ni con la exposición a una mayor concentración y a la combinación de los tres metales.

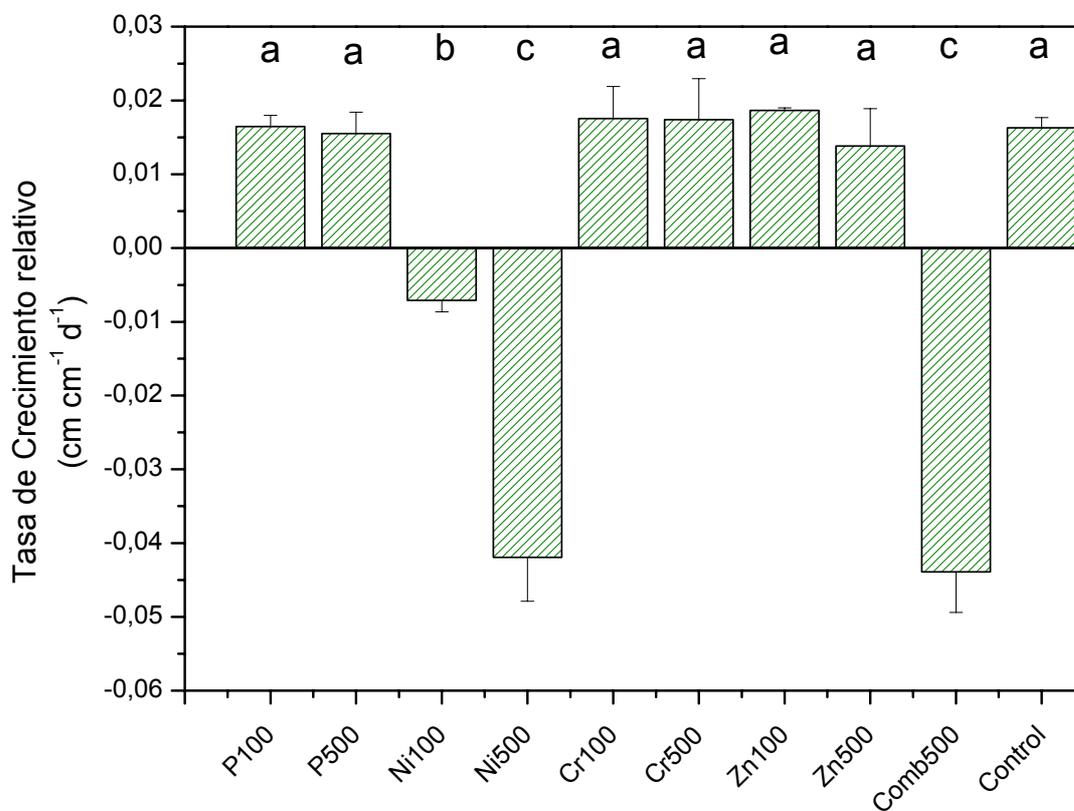


Fig. 2.19. Tasa de crecimiento relativo ($\text{cm cm}^{-1} \text{d}^{-1}$) calculado de acuerdo a la altura de plantas en todos los tratamientos. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

En los tratamientos de P se obtuvieron porcentajes de aumento de clorofila significativamente superiores que el obtenido en los demás tratamientos, mientras que no se encontraron diferencias significativas con el control (Fig. 2.20), sin embargo, el porcentaje obtenido en el tratamiento P500 fue significativamente menor que el obtenido en el de P100. Los tratamientos P500 y Zn100 no presentaron diferencias significativas. Los porcentajes de aumento de clorofila en los tratamientos de Cr y Zn mostraron diferencias significativas con el control (Fig. 2.20). Los porcentajes de aumento de clorofila en los tratamientos de Ni y de metales combinados fueron negativos, siendo el de metales combinados significativamente menor que el obtenido en los tratamientos de Ni.

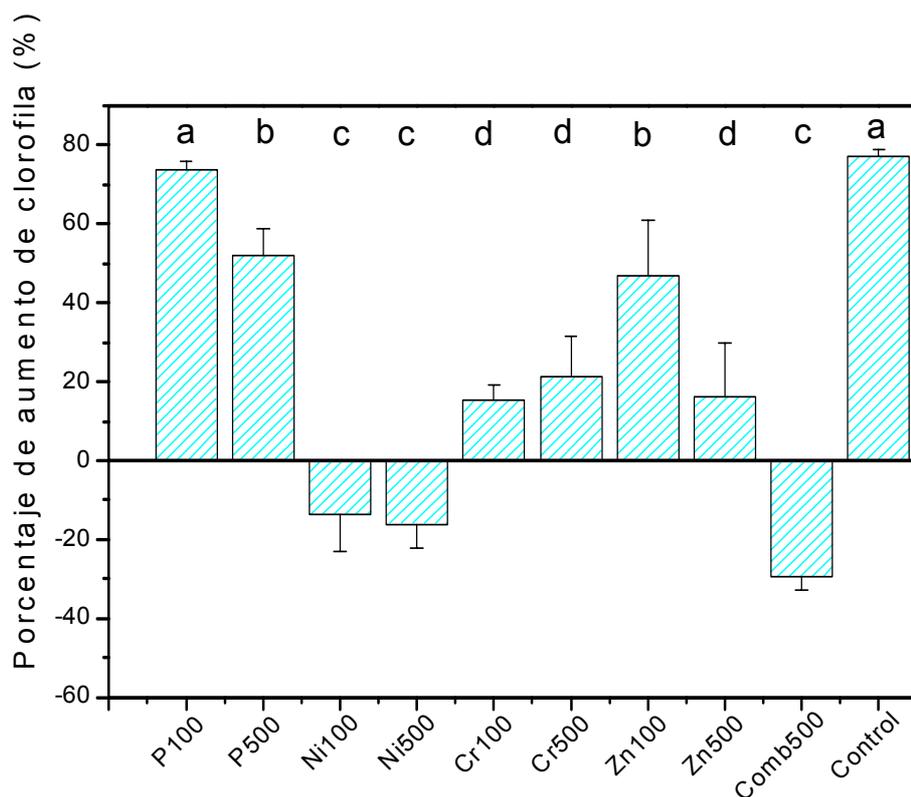


Fig. 2.20. Porcentaje de aumento de clorofila (%) de plantas de *T. domingensis* en todos los tratamientos.

En cuanto a los parámetros morfométricos internos de raíces puede observarse que las menores ATR y ATV se registraron en los tratamientos de Ni100, Ni500 y Comb500, mientras que las más altas ATR y ATV se observaron en P500, Cr100 y Zn100 (Fig. 2.21). En cuanto a las ATM, las menores áreas se observaron en el tratamiento de Ni500; las más altas ATM se observaron en P100 y Cr500. Los más bajos NV se observaron en los tratamientos de P500, Ni500 y Zn500, mientras que los máximos NV se observaron en los tratamientos P100, Ni100, Cr500 y Comb500.

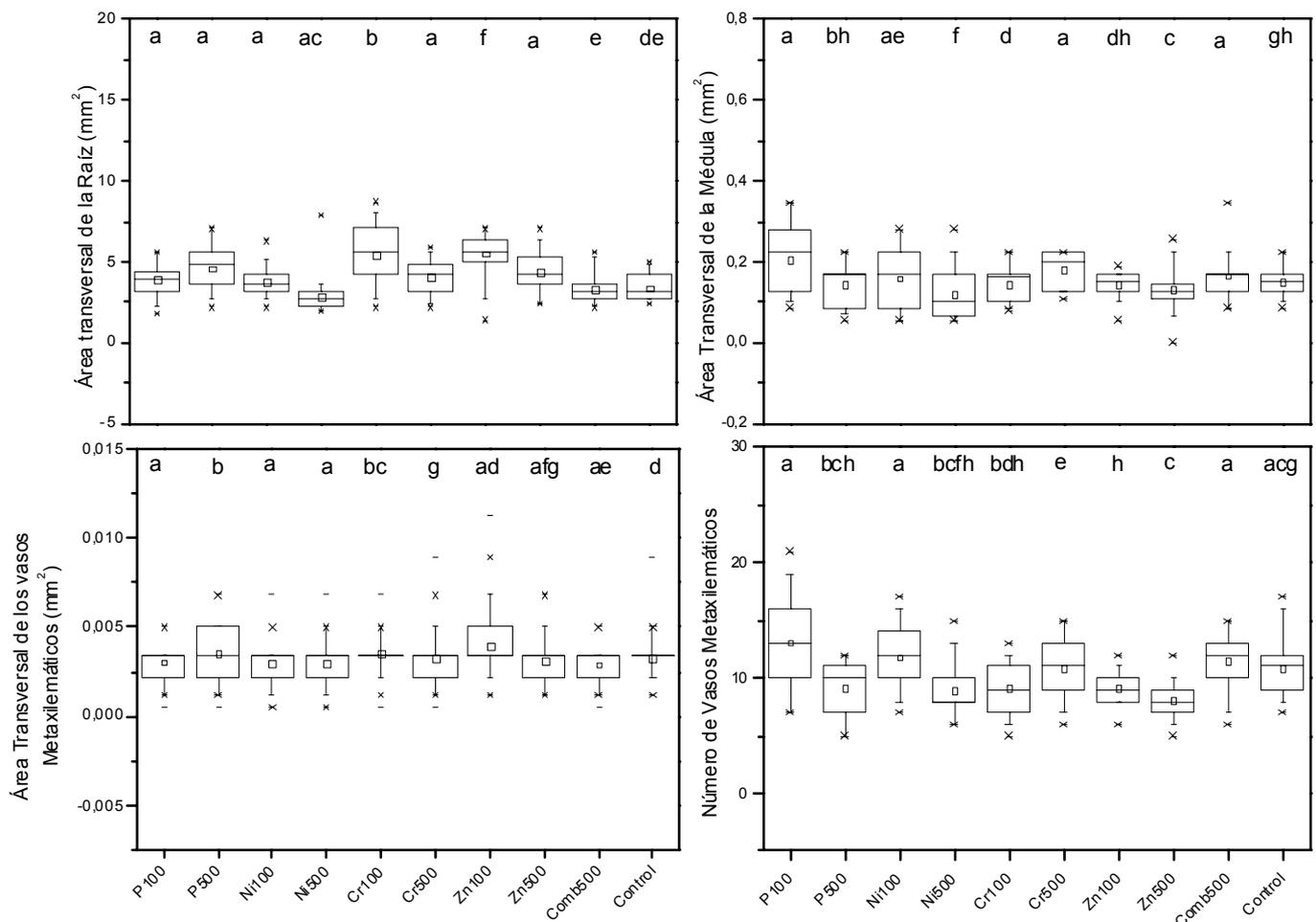


Fig. 2.21. Parámetros morfométricos internos de las raíces (ATR, ATM, ATV y NV) obtenidas en todos los tratamientos. Diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

2.4.4. Consideraciones finales:

En los tratamientos con concentraciones de 500 mg L⁻¹ de metales y de metales combinados se observó una menor remoción en agua, podemos hipotetizar que *T. domingensis* toleró esas concentraciones de metales debido a que dejó de absorberlos, posiblemente para evitar que estas concentraciones causen daños irreversibles en órganos vitales. Por otro lado, las partes sumergidas de las hojas fueron un compartimiento muy eficiente para la acumulación de metales y P debido a que estos tejidos se encuentran en contacto directo con la solución experimental. Sin embargo, fue el sedimento el compartimiento que presentó la mayor acumulación de metales y de P. Las plantas no

toleraron la exposición a 100 mg L^{-1} Ni y 500 mg L^{-1} Ni y la combinación de 500 mg L^{-1} Cr + 500 mg L^{-1} Ni + 500 mg L^{-1} Zn.

2.5. Experiencia N° 4: Estudio de la tolerancia de plantas de *T. domingensis* a mayores concentraciones de metales y nutrientes

2.5.1. Objetivo:

De acuerdo con los resultados obtenidos en la experiencia anterior, se realizó esta experiencia para poder evaluar la tolerancia de *T. domingensis*, en base a la tasa de crecimiento y a la concentración de clorofila, al ser sometida a altas concentraciones de metales pero con el agregado de nutrientes (P y N).

2.5.2. Metodología:

Diseño experimental:

Se realizó una experiencia en invernadero con el fin de observar la tolerancia de *T. domingensis* cuando es sometida a altas concentraciones de metales (Cr, Ni y Zn) y nutrientes (P y N) agregados en forma conjunta y separada.

Las plantas se recolectaron en un ambiente natural ubicado en la localidad de Rincón, Santa Fe (Sitio 3, $31^{\circ} 36' 18.46''$ S; $60^{\circ} 33' 50.04''$ O). Se colocaron dos plantas por en cada contenedor plástico en los que se agregó 4 Kg de sedimento. Luego se aclimataron en invernadero durante 15 días. Luego, fueron podadas a una altura de aproximadamente 20 cm y se agregaron soluciones de metales y nutrientes según los siguientes tratamientos:

- 1) 200 mg L^{-1} Cr (Cr200)
- 2) 600 mg L^{-1} Cr (Cr600)
- 3) 200 mg L^{-1} Ni (Ni200)
- 4) 600 mg L^{-1} Ni (Ni600)
- 5) 200 mg L^{-1} Zn (Zn200)
- 6) 600 mg L^{-1} Zn (Zn600)
- 7) 200 mg L^{-1} Cr + 200 mg L^{-1} Ni + 200 mg L^{-1} Zn (Comb200)
- 8) 600 mg L^{-1} Cr + 600 mg L^{-1} Ni + 600 mg L^{-1} Zn (Comb600)

- 9) $200 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr} + 200 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni} + 200 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn} + 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ P} + 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$
(Comb200 + nut.)
- 10) $600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr} + 600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni} + 600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn} + 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ P} + 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$
(Comb600 + nut.)
- 11) $50 \text{ mg L}^{-1} \text{ P} + 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ N}$ (nut.)
- 12) Control, sin el agregado de metales ni de nutrientes

El nivel de agua de los acuarios se mantuvo mediante el agregado de agua del sitio de muestreo.

Estudio de la vegetación:

Periódicamente, se midió la altura de plantas, y al inicio y al final de la experiencia se midió la concentración de clorofila (la cual fue expresada como porcentaje de aumento de clorofila). Se calcularon las tasas de crecimiento relativo en base a la altura de plantas.

Análisis químico:

Se efectuó una caracterización físico-química en el agua del sitio de muestreo donde se recolectaron las plantas para la realización del experimento. Para caracterizar el agua del sitio de muestreo se siguieron las técnicas explicadas en la sección de materiales y métodos. Durante el experimento, se muestreó el agua sobrenadante de cada acuario a los 0hs, 8hs, 24hs, 48hs, 5 días, 10 días, 20 días y 30 días, tiempo que duró la experiencia.

Análisis estadístico:

Se realizaron análisis de la varianza de una vía para determinar si existieron diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados para las tasas de crecimiento relativo y para el porcentaje de aumento de clorofila.

2.5.3. Resultados:

Las Tablas 2.13 y 2.12 muestran la caracterización físico-química del agua y sedimento del sitio de muestreo donde se recolectaron las plantas para la realización del experimento.

Tabla 2.13. Caracterización físico química del agua del sitio de muestreo (Sitio 3) (ND=no detectado, LD=límite de detección).

Parámetros	WN
pH	7,42
Conductividad ($\mu\text{mho cm}^{-1}$)	2102
Sólidos Totales (mg L^{-1})	1399,9
Alcalinidad (CaCO_3) (mg L^{-1})	278,2
HCO_3^- (mg L^{-1})	339,4
CO_3^{2-} (mg L^{-1})	ND
Cl^- (mg L^{-1})	354,1
SO_4^{2-} (mg L^{-1})	410,6
Dureza Total (CaCO_3) (mg L^{-1})	212,6
Ca^{2+} (mg L^{-1})	63,7
Mg^{2+} (mg L^{-1})	26,3
Na^+ (mg L^{-1})	331,8
K^+ (mg L^{-1})	33,9
Fe (mg L^{-1})	0,282
Cr (mg L^{-1})	ND (LD=0.005)
Ni (mg L^{-1})	ND (LD=0.005)
Zn (mg L^{-1})	ND(LD=0.005)
PRS (mg L^{-1})	0,119
PT (mg L^{-1})	1,154
NO_2^- (mg L^{-1})	ND (LD= 0.005)
NO_3^- (mg L^{-1})	0,2
NH_4^+ (mg L^{-1})	2,12
DBO (mg L^{-1})	2,7
DQO (mg L^{-1})	5,0
OD (mg L^{-1})	6,03

Tabla 2.14. Caracterización química de los sedimentos comerciales (SC) y del wetland natural (WN) y vegetales (raíz, hoja y rizoma) del sitio de recolección (Sitio3).

Parámetros	SC	WN	Raíz	Rizoma	Hoja
Cr (mg g^{-1})	0,014	ND	0,03	ND	0,008
Ni (mg g^{-1})	0,005	ND	0,024	ND	0,003
Zn (mg g^{-1})	0,142	ND	0,26	ND	0,055
PT (mg g^{-1})	0,455	0,201	3,621	2,842	4,031

A excepción del tratamiento de Ni600, todas las tasas de crecimiento relativo fueron positivas (Fig. 2.22). Las tasas de crecimiento de los tratamientos de Cr600 y Zn600, tanto en los acuarios que se agregaron nutrientes como en los que no, fueron significativamente inferiores que los tratamientos de Cr200 y Zn200, demostrando una inhibición debida a la exposición a las elevadas concentraciones. Los tratamientos de Cr y Zn en los que se agregaron nutrientes mostraron tasas de crecimiento significativamente superiores que los tratamientos en los que no se agregaron. Por su parte, el tratamiento de Zn200 con el agregado de nutrientes no mostró diferencias significativas con el control, mientras que el resto de los tratamientos fueron significativamente inferiores al control, indicando una menor toxicidad del Zn.

Con el agregado de nutrientes, los tratamientos de Ni200 y Ni600 mostraron una tasa de crecimiento significativamente mayor en comparación con los tratamientos en los que no se agregaron nutrientes. El tratamiento que presentó la mayor toxicidad fue el de Ni600 sin agregado de nutrientes, el cual mostró una tasa de crecimiento negativa. Sin embargo, el mismo tratamiento con el agregado de nutrientes presentó una tasa positiva, aunque significativamente menor que el tratamiento Ni600 con agregado de nutrientes. Por su parte, los tratamientos de metales combinados mostraron una respuesta similar a la obtenida en los tratamientos de Cr y Zn aunque con tasas de crecimiento significativamente inferiores. Aunque se esperaba que el tratamiento con nutrientes hubiera mostrado tasas de crecimiento mayores que en el control, no se observaron diferencias significativas entre ellos, probablemente debido a que la exposición a las concentraciones de nutrientes utilizadas produjo algún tipo de inhibición fisiológica. Al igual que en los experimentos anteriores, el Ni fue el metal que mostró la mayor toxicidad.

Es de destacar que en los tratamientos que presentaron la mayor toxicidad se observó una escasa aparición de nuevas plantas, observándose en el tratamiento con la mayor concentración de metales combinados la inexistencia de propagación vegetativa.

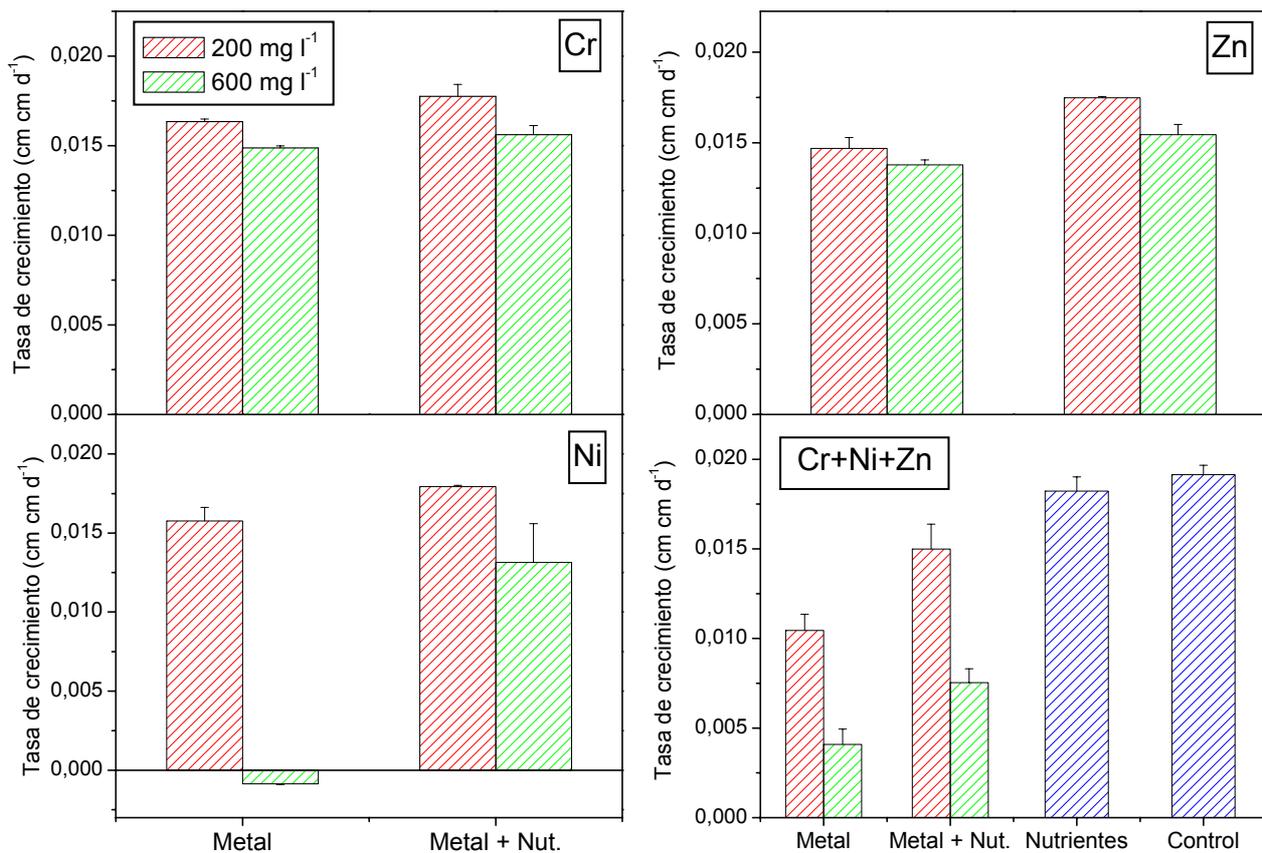


Fig. 2.22. Tasas de crecimiento (cm cm d^{-1}) obtenidas en cada tratamiento de Cr, Ni, Zn y nutrientes.

Los tratamientos con agregado de nutrientes presentaron porcentajes de aumento de clorofila significativamente superiores a los registrados en los tratamientos en los que no se agregaron nutrientes, excepto en los tratamientos de metales combinados y en el de Ni600 (Fig. 2.23). En los tratamientos de Cr+Ni+Zn200, se observaron aumentos de clorofila significativamente inferiores que los del control, mientras que en los tratamientos de Cr+Ni+Zn600 se observó una disminución en la concentración de clorofila. Todos los tratamientos mostraron porcentajes de aumento de clorofila significativamente inferiores al control, demostrando una inhibición en este parámetro debida a la exposición a las altas concentraciones de metales y nutrientes.

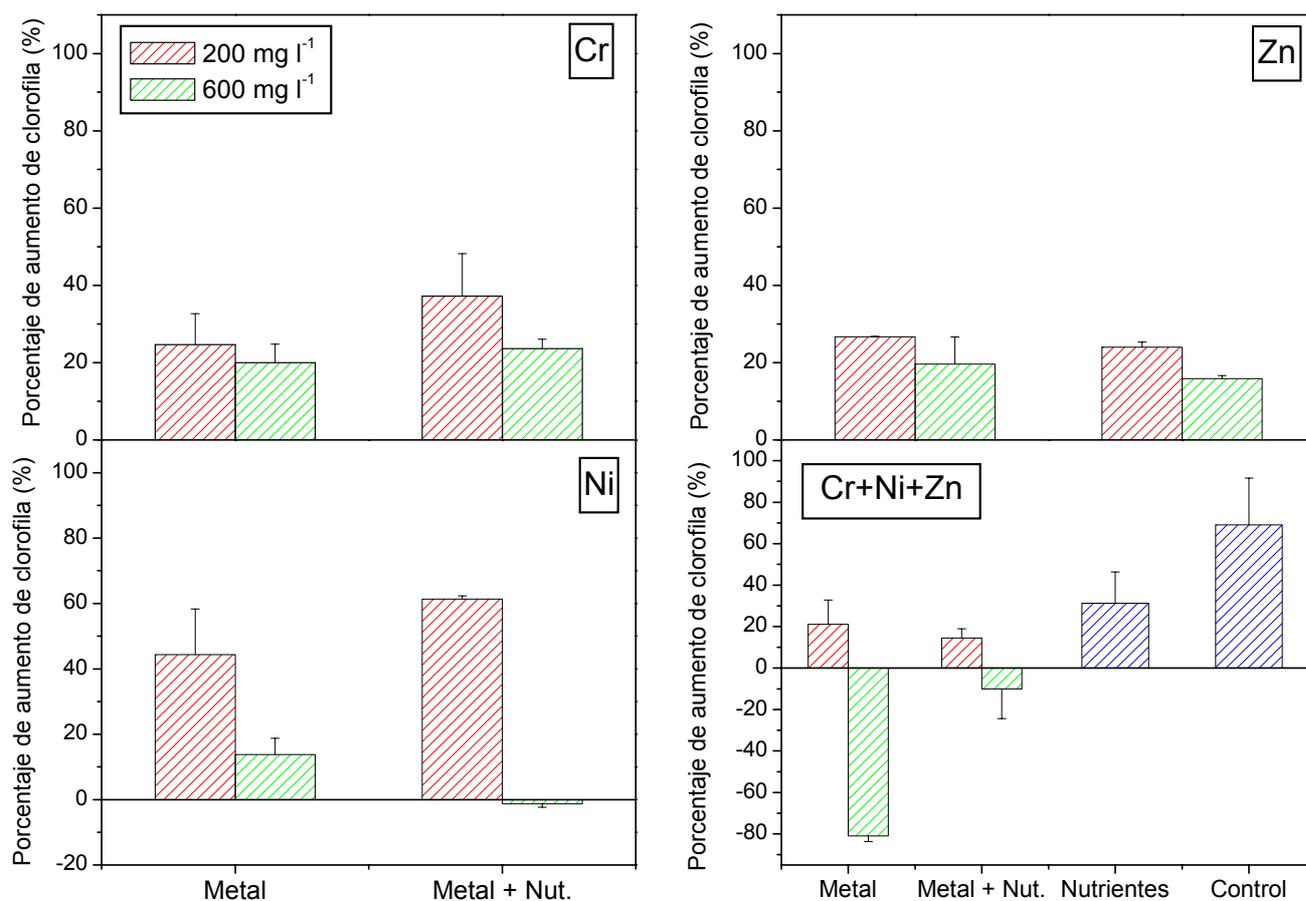


Fig. 2.23. Porcentajes de aumento de la concentración de clorofila (%) obtenidos en cada tratamiento de Cr, Ni, Zn y nutrientes.

2.5.4. Consideraciones finales:

Las plantas no toleraron la exposición a 600 mg L⁻¹ Ni y se observó inhibición en el crecimiento frente a la combinación de 600 mg L⁻¹ Cr + 600 mg L⁻¹ Ni + 600 mg L⁻¹ Zn. Sin embargo, el agregado de nutrientes favoreció la tolerancia de las plantas, representada por el aumento en la tasa de crecimiento y la concentración de clorofila.

Si bien en el experimento N° 3 se observó que en los tratamientos de Ni100 y Ni500 las plantas mostraron tasas de crecimiento negativo, en este experimento el tratamiento Ni200 mostró una tasa positiva. Esto pudo deberse probablemente a que las plantas utilizadas en este experimento mostraron una mayor concentración inicial de PT en tejidos (Tabla 2.14) que la registrada en los tejidos de las plantas utilizadas en el experimento

anterior (Tabla 2.10), por lo cual, presentaron una mayor tolerancia a las condiciones experimentales.

2. 6. Discusión del Capítulo:

Aunque los 3 metales alcanzaron similares remociones finales, el Cr presentó una mayor eficiencia y una mayor velocidad de remoción que los otros metales. Similares resultados fueron informados para las macrófitas flotantes *P. stratiotes* y *S. herzogii*, las cuales mostraron eficiencias de 98-99% después de 30 días de experimentación utilizando concentraciones de 1, 2, 4 y 6 mg L⁻¹ (Maine et al., 2004). Estos autores propusieron que la remoción obtenida se debió al hecho de que la sorción de Cr(III) es probablemente un mecanismo competitivo-consecutivo con etapas de reacción reversibles, esto se refleja en que los porcentajes de remoción nunca llegan al 100% cualquiera sea la condición inicial, además propusieron que *P. stratiotes* y *S. herzogii* pueden tomar Cr del agua a través de la sorción sobre la superficie de las hojas por contacto directo con la solución. En el presente trabajo pudo observarse que la adsorción a las partes sumergidas de las hojas de *T. domingensis* es un mecanismo muy importante debido al contacto directo de estos tejidos con la solución, lo mismo fue observado por Hegazy et al. (2011) quienes estudiaron la acumulación de metales pesados (Al, Fe, Zn y Pb) de un humedal natural contaminado con efluentes industriales en distintos órganos de *T. domingensis*. Estos autores pudieron observar que esta especie acumuló mayor concentración de Zn en las partes sumergidas de hojas en comparación con las raíces y los rizomas.

El Cr, Ni y Zn intervienen en una variedad de funciones críticas relacionadas con el control de genes, el transporte de oxígeno y el metabolismo enzimático (Bonilla, 2008; Rana, 2008). Sin embargo, cuando sus concentraciones alcanzan un valor umbral estos metales se vuelven primero inhibitorios y luego tóxicos.

Comparando con el control, la tasa de crecimiento mostró un efecto tóxico en los tratamientos de Ni100 y Ni500 y en el tratamiento de metales combinados en la experiencia N° 3 (Fig. 2.19) y en el tratamiento de Ni600 de la experiencia N° 4 (Fig. 2.22), mientras que el Cr y el Zn no afectaron el crecimiento, o bien mostraron un efecto inhibitorio según las concentraciones utilizadas en cada experimento. En comparación con macrófitas flotantes, estos resultados concuerdan con los informados por Hadad et al. (2007) al estudiar la tolerancia de *S. herzogii* al Cr, Ni y Zn; cabe aclarar que las concentraciones de metales a las cuales se expuso a estas macrófitas flotantes son mucho menores que con los que se

trabajaron con *T. domingensis* y con los resultados de Mufarrege et al. (2010) al estudiar la respuesta de *P. stratiotes* a los mismos metales. Delgado et al. (1993) observaron que *E. crassipes* también toleró al Cr y Zn. Respecto a la tolerancia de macrófitas arraigadas, Chandra y Yadav (2010) evaluaron la potencialidad de *Typha angustifolia* para ser utilizada en la fitoremediación de Cu, Pb, Ni, Fe, Mn y Zn observando una tolerancia a las condiciones experimentales. Yadav y Chandra (2010) observaron que *T. angustifolia* fue más tolerante a la exposición de Fe, Cr, Pb, Cu y Cd que la especie *Cyperus esculentus* L. Por su parte, Arduini et al. (2006) observaron que el crecimiento de la especie enraizada *Miscanthus sinensis* se detuvo al ser expuesta a concentraciones de Cr de 150 mg L⁻¹.

La presencia de nutrientes en agua contribuyó a aumentar la tolerancia de *T. domingensis* a los metales estudiados. Incluso, pudo observarse que las concentraciones de nutrientes en tejidos también aumentan la tolerancia. Esto explica el hecho de que las plantas utilizadas en el experimento N° 4 presentaron una mayor tolerancia a las condiciones experimentales debido a una mayor concentración inicial de PT en tejidos que la registrada en los tejidos de las plantas utilizadas en el experimento anterior. Gothberg et al. (2004) propusieron aplicar una fertilización con nutrientes para atenuar la acumulación de metales en macrófitas y así aumentar la tolerancia a los mismos. El enriquecimiento con nutrientes mejoraría la remoción de metales de agua a través del aumento en la producción de biomasa y del mejoramiento del metabolismo (Hadad et al., 2007).

La concentración de clorofila en plantas es un buen indicador de toxicidad para diferentes metales (Burton et al., 2004; Hadad et al., 2007). Sin embargo, las respuestas de las plantas dependerán del contaminante estudiado y de las especies de macrófitas. Los tratamientos de Ni100, Ni500 y de metales combinados fueron tóxicos para la síntesis de clorofila *a* en la experiencia N° 3 (Fig. 2.20) en los tratamientos Ni600 con agregado de nutrientes y de metales combinados en la experiencia N° 4. Manios et al. (2003) observó un aumento en la hidrólisis de la clorofila *a* debido a la exposición a metales combinados (4 mg L⁻¹ Cd, 80 mg L⁻¹ Cu, 40 mg L⁻¹ Ni, 40 mg L⁻¹ Pb y 80 mg L⁻¹ Zn) en *T. latifolia*. Por su parte, el Cr y el Zn en forma separada no produjeron toxicidad sobre este parámetro ya que el Cr produce el aumento de la concentración de clorofila incrementando la disponibilidad de Fe biológicamente activo en los tejidos vegetales (Bonet et al., 1991) y el Zn interviene en los procesos fotosintéticos. Los metales podrían ser directamente ó indirectamente esenciales para la síntesis de clorofila (Chandra et al., 2004). Respecto de estudios realizados con especies flotantes, Delgado et al. (1993) observaron clorosis en *E. crassipes* al exponerla a concentraciones crecientes de Cr y Zn, siendo la clorosis más intensa en el caso del Zn.

Hadad et al. (2011) observó un efecto tóxico sobre la concentración de clorofila al exponer a *E. crassipes* a una concentración de Ni de 1 mg L^{-1} . Maine et al. (2004) informó una disminución en la concentración de clorofila en *P. stratiotes* cuando esta especie fue expuesta a concentraciones superiores a 3 mg L^{-1} Cr, mientras que la clorofila en *S. herzogii* no disminuyó al ser expuesta a concentraciones de Cr inferiores a 6 mg L^{-1} . Cuando el Cr se encuentra en bajas concentraciones pueden aumentar la concentración de clorofila debido a que aumenta la disponibilidad de Fe biológicamente activos en los tejidos de las plantas (Bonet, et al. 1991) y el Zn participa de procesos fotosintéticos (Bonilla, 2008), pero cuando estos metales se encuentran en altas concentraciones son tóxicos causando daños en la producción de clorofila.

Las concentraciones en las especies flotantes que produjeron efectos fueron más bajas. Debido a que las macrófitas flotantes se encuentran en contacto directo con la solución experimental, presentan una menor tolerancia a los metales, mientras que *T. domingensis* mostró una tolerancia mucho mayor a los metales estudiados debido a que el sedimento es el primer compartimiento de acumulación de metales produciendo que éstos lleguen con posterioridad y en menor concentración a los tejidos vegetales.

Con respecto a los factores de bioacumulación que se obtuvieron a lo largo del tiempo en la experiencia N° 2, se pudo observar que en el muestreo inicial, las mayores concentraciones se observaron en el sedimento, mientras que a partir de las 2 primeras horas de experimentación, los tres metales se acumularon en raíces (Tabla 2.8). Para los factores de translocación obtenidos a lo largo del tiempo, pudo observarse una primera etapa donde los metales se acumularon en raíces (Tabla 2.7). Luego, a partir del séptimo día de experiencia, los tres metales mostraron una mayor concentración en hojas, distinguiéndose una etapa de translocación de metales desde raíces hacia partes aéreas. Sin embargo, el Cr y el Zn a los 60 y 90 días mostraron una nueva translocación pero en sentido inverso, desde partes aéreas hacia raíces. Probablemente, debido a las elevadas concentraciones de metales utilizadas los sitios de sorción de raíces se saturaron durante los primeros 7 días y se produjo la translocación hacia partes aéreas. Luego, a los 60 días, los sitios de acumulación en las partes aéreas se saturaron y los metales se translocaron hacia las raíces nuevamente. De acuerdo a estos resultados podemos hipotetizar que las plantas translocan de forma alternada los metales, como un mecanismo de protección de los tejidos de órganos funcionalmente activos (hojas y raíces) protegiendo de esta forma a las plantas de la toxicidad de estos contaminantes. De esta manera, los tejidos fotosintéticos y de absorción de nutrientes para las plantas pueden continuar con sus funciones y es por esto que se le atribuye a esta especie

una alta tolerancia a lo largo del tiempo. Cabe aclarar que estos resultados fueron observados cuando se sometió a *T. domingensis* a elevadas concentraciones de metales y que estas condiciones no se observan en humedales naturales ni construidos para el tratamiento de efluentes industriales. Arduini et al. (2006) observaron que *M. sinensis* transportó Cr desde hojas verdes hacia hojas secas como un mecanismo de protección demostrando la movilidad de los contaminantes dentro de la planta.

En los experimentos realizados en este capítulo se observó que *T. domingensis* tolera elevadas concentraciones de Cr, Ni, Zn y P y que sus tejidos poseen una alta capacidad de acumulación de contaminantes, siendo las partes sumergidas de las hojas el tejido que más los acumula. En la experiencia N° 3 se utilizaron concentraciones muy altas de los mismos, en esta experiencia se decidió determinar sus concentraciones en las partes sumergidas de las hojas debido a que éstas se encuentran en contacto directo con la solución experimental. Generalmente, los tejidos radiculares acumulan una significativamente mayor concentración de metales que las hojas, indicando una movilidad limitada una vez que los metales ingresan a la planta. Estos resultados fueron observados para macrófitas emergentes (Deng et al. 2004; Keller et al. 1998; Taylor y Crowder 1983; Ye et al., 1997; Sinha y Gupta, 2005; Fritioff y Greger, 2006; Sousa et al., 2008; Yadav y Chandra, 2010), macrófitas flotantes libres (Banerjee y Sarker, 1997; Satyakala y Kaiser, 1997; Hadad et al., 2007; Hadad et al., 2011; Mufarrege et al., 2010) e incluso en especies leñosas (Yu et al., 2008). Sin embargo, en la experiencia N° 2 se observó que la parte aérea acumuló elevadas concentraciones de metales y en la experiencia N° 3 se observó que la acumulación se producía en las partes sumergidas de hojas debido a que se encuentran en contacto directo con la solución. No se encontraron trabajos que hayan observado este tipo de acumulación en forma experimental. Este hecho tendría implicancias ambientales ya que la presencia de los contaminantes en las hojas podría producir una acumulación de los mismos en las cadenas tróficas. Arduini et al. (2006) observaron una acumulación significativamente superior de Cr en hojas muertas de *M. sinensis* en comparación con las hojas verdes como un mecanismo adicional de detoxificación al ser expuesta a una concentración de 150 mg L⁻¹ Cr. Por otro lado Xu et al. (2011a) estudiaron los mecanismos de detoxificación de *Typha angustifolia* sometida a Cd, ellos encontraron que esta especie es altamente tolerante al Cd debido a los mecanismos de detoxificación que poseen las raíces (banda de Caspary, pared celular, vacuolas, glutatión y glutatión peroxidasa).

El sedimento fue el compartimiento que mostró la mayor acumulación de contaminantes. Aunque las macrófitas juegan un rol clave en la retención de contaminantes

en un wetland construido, ya que no solo acumulan contaminantes en sus tejidos, sino que influyen en la biogeoquímica del sedimento, a través de la traslocación de oxígeno a la rizosfera, el sedimento demostró ser el principal compartimiento de acumulación de P y metales, coincidiendo con trabajos previos, (Panigatti y Maine, 2003, Maine et al., 2009).

En cuanto a los parámetros morfométricos internos de raíces se pudo observar que a altas concentraciones de metales hay cambios significativos en estos parámetros. Mufarrege et al. (2010) observó resultados similares en *P. stratiotes* al ser sometida a metales en forma combinada. Arduini et al. (2006) observaron que a una concentración de 100 mg L^{-1} de Cr las longitudes de raíces aumentaban, mientras que el diámetro de las mismas disminuía, ocurriendo lo contrario a concentraciones superiores de Cr. Campanella et al. (2005) registraron cambios debidos a la acumulación de P en la morfología interna de raíces de *E. crassipes* en un humedal artificial para el tratamiento de un efluente cloacal luego de 3 meses de operación. Estos autores observaron mayores ATR en aquellas raíces que se ubicaron en la zona de entrada del humedal donde se recibía el efluente en comparación con las plantas localizadas en la zona de salida. Por su parte, Xie y Yu (2003) registraron cambios producidos en la morfología interna, externa y en la funcionalidad de las raíces de *E. crassipes* producidos por la exposición a diferentes concentraciones de P.

Capítulo 3

ESTUDIOS EN UN WETLAND CONSTRUIDO Y EN UN WETLAND NATURAL

3.1. Introducción:

En el año 2002 una empresa metalúrgica de la zona tomó contacto con el grupo del cual formo parte, para evaluar la factibilidad de realizar un tratamiento o pulido final a sus efluentes. Para realizar este estudio se decidió, utilizando un wetland a escala piloto para evaluar las especies vegetales a utilizar en función del efluente a tratar y las características de la zona (Maine et al., 2006; 2007; Hadad et al. 2006).

De once macrófitas transplantadas las especies flotantes tuvieron un gran desarrollo durante los primeros años, para luego desaparecer. Después de tres años de operación, sólo *T. domingensis* alcanzó una cobertura del 80% convirtiéndose en la dominante mostrando un crecimiento significativamente superior al de un ambiente natural (Hadad et al., 2006). Los metales (Cr, Ni y Zn), nutrientes, DQO y DBO disminuyeron significativamente en el efluente luego de atravesar este humedal experimental (Maine et al., 2005). Debido a las ampliamente satisfactorias eficiencias de remoción de contaminantes obtenidas en el humedal piloto, la empresa decidió la construcción de un humedal a gran escala para tratar los efluentes de la fábrica (cloacal e industrial, ambos ingresan al humedal después de un tratamiento primario). El humedal se encuentra en operación y monitoreo desde noviembre de 2002. Los vegetales que se utilizaron en este humedal, se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados sobre tolerancia a las condiciones del medio y eficiencia en la retención de contaminantes obtenidos en la experiencia piloto previa. Las macrófitas seleccionadas se recolectaron de humedales naturales de la llanura aluvial del Río Paraná Medio. En la Tabla 3.1 se muestra un listado del total de las especies transplantadas al inicio de la etapa de operación. Al igual de lo que ocurrió en el humedal construido a escala piloto, después de un período de dominancia de especies flotantes, *T. domingensis* se convirtió en la dominante desde el 2005 lo que motivó que se realizara este trabajo de tesis, como ya se explicó, estudiando su tolerancia y comportamiento ante las condiciones del wetland (Maine et al., 2007, 2009), para así poder explicar cuáles fueron los factores que hacen que esta especie allá sido tolerante y lo siga siendo hasta la actualidad.

El monitoreo del humedal continúa hasta la actualidad. En la presente tesis se informan los resultados sobre su eficiencia en la retención de Cr, Ni, Zn y nutrientes durante el período comprendido entre Abril de 2007 y Abril de 2011, además de informar los estudios llevados a cabo a fin de evaluar los efectos del efluente tratado sobre el crecimiento de la vegetación.

Tabla 3.1. Lista de las especies vegetales utilizadas en el humedal definitivo, ordenadas por familia botánica.

Familia	Nombre científico	Nombre vulgar	Tipo de planta
Araceae	<i>Pistia stratiotes</i> L.	Repollito de agua	Flotante
Cyperaceae	<i>Schoenoplectus californicus</i>	Falso junco	Emergente
Gramineae	<i>Panicum elephantipes</i> Ness. ex Trin.	Canutillo	Emergente
Lemnaceae	<i>Spirodela polyrhiza</i> (L.) Schleid.	Lenteja de agua	Flotante
Pontederiaceae	<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms.	Camalote	Flotante
Pontederiaceae	<i>Pontederia cordata</i> L.	Aguapey	Flotante
Salviniaceae	<i>Salvinia rotundifolia</i> Willd.	Helechito de agua	Flotante
Typhaceae	<i>Typha domingensis</i> Pers.	Totorá	Emergente
Umbelifera	<i>Hydrocotyle ranunculoides</i> L. F.	Redondita de agua	Flotante

3.2. Metodología:

3.2.1. Características del humedal construido:

Las características del humedal se describen en la sección de Materiales y Métodos.

3.2.2. Análisis realizados:

En el humedal construido se realizó un monitoreo sistemático del afluente y efluente del humedal, del sedimento de la zona de entrada y de salida y del crecimiento y concentraciones de metales y nutrientes de la vegetación.

Se estudió la eficiencia del humedal en la retención de los contaminantes del agua a partir del análisis químico del afluente y efluente del humedal. El porcentaje de remoción del agua de cada parámetro se calculó en cada muestreo según la ecuación:

$$\% \text{ de remoción} = \frac{\text{concentración en el afluente} - \text{concentración en el efluente}}{\text{Concentración en el afluente}} \times 100$$

En el afluente y efluente se determinaron mensualmente los siguientes parámetros: temperatura, pH, conductividad, sólidos suspendidos, OD, sulfato, Ca, Mg, Na, Fe, K, PRS,

nitrito, nitrato, amonio, Cr, Ni, Zn, DQO y DBO. Las muestras de agua se tomaron por triplicado.

La determinación de los contaminantes acumulados en los tejidos vegetales y en sedimentos permitió determinar en qué compartimiento se retenían. A fin de comparar bioacumulación entre los distintos órganos de *T. domingensis*, se determinó mensualmente la concentración de PT, Cr, Ni y Zn en partes aéreas y subterráneas. Para medir estas concentraciones se recolectaron tres plantas al azar determinando en cada una por separado las concentraciones de los contaminantes mencionados.

En sedimentos se determinó mensualmente la concentración de PT, Cr, Ni y Zn. Los sedimentos se recolectaron con un muestreador tubular plástico de 4,5 cm de diámetro realizando tres réplicas en la zona de entrada y tres en la de salida.

3.2.3. Estudio de la vegetación:

Se estimó el peso seco vegetal. Para esto las plantas se recolectaron con un marco cuadrado de 50 cm de lado que se arrojó cinco veces al azar en las zonas vegetadas (APHA, 1998) de la entrada y salida del humedal. Se cosechó la biomasa aérea de todas las plantas halladas en su interior siguiendo la metodología propuesta por Westlake (1974) y APHA (1998). Las muestras se colocaron en estufa a 105°C hasta obtener peso constante (Westlake, 1974; APHA, 1998). Se estimó la cobertura midiendo proporcionalmente la superficie aproximada que ocupó *T. domingensis* dentro del humedal, obteniendo así un porcentaje en función de la superficie total del mismo. Además, se midió la altura de plantas y el número de plantas por cada m² (densidad) y se determinó mensualmente la concentración de clorofila en plantas de la zona de entrada y de salida del humedal. Se realizaron cortes transversales de raíces que se examinaron en microscopio óptico. Se analizaron 30 secciones de raíces de plantas de la zona de entrada y de salida donde se midió el ATR, ATM, NV y ATV.

3.2.4. Estudios en humedales naturales:

Con el objeto de analizar si las plantas del humedal artificial modificaron su altura, densidad, biomasa, concentración de clorofila y morfología radicular interna, se compararon con muestras tomadas con un marco cuadrado de 50 cm de lado, arrojando dicho marco cinco veces al azar en zonas vegetadas en su hábitat natural realizando un seguimiento

periódico y simultáneo de las macrófitas en humedales naturales no contaminados pertenecientes a la llanura de inundación del Río Paraná Medio. *T. domingensis* se estudió en un cuerpo de agua somero con escasa velocidad de corriente y sedimento arcilloso. El humedal natural donde se colectaron las plantas corresponde al sitio 2 del cual se colectaron las plantas para realizar las experiencias N° 2 y 3 (Capítulo 2) (Fig. 3.5). Además, en cada muestreo se determinó la característica físico-química del agua y se determinó la concentración de PT, Cr, Ni y Zn del sedimento y de las hojas y raíces de *T. domingensis*.

3.2.5. Determinaciones analíticas:

Se utilizaron las mismas técnicas analíticas que en las experiencias de invernadero (Capítulo 2).

3.2.6. Análisis estadístico:

A fin de determinar la eficiencia del humedal construido en la remoción de contaminantes, se comparó la media del afluente con la del efluente de cada parámetro de calidad de agua medido (test de diferencia de medias).

Se determinó si existieron diferencias significativas entre las concentraciones de PT, NTK, Cr, Ni y Zn medidas en el sedimento de la zona de entrada y de salida, utilizando ANOVA de dos factores (lugar de muestreo y tiempo). Para cada contaminante (P, N, Cr, Ni y Zn) se realizó un ANOVA de un factor (órganos vegetativos) para determinar si existieron diferencias significativas entre las concentraciones de los contaminantes. La biomasa seca, densidad y altura de plantas se compararon entre la zona de entrada y de salida del humedal construido y con el humedal natural, mediante ANOVA de dos factores (sitio de muestreo y tiempo).

3.3. Resultados:

3.3.1. Cambios en la cobertura por perturbaciones externas:

Durante el estudio realizado en el humedal construido se observaron distintas perturbaciones y se llevaron a cabo acciones de mantenimiento. En Junio de 2007 se procedió a cosechar las plantas de *T. domingensis*, lo cual produjo una disminución de la

cobertura (Fig. 3.1). Durante septiembre y octubre de 2008 se realizó una nueva cosecha de las partes aéreas, observando una disminución de la cobertura. Además, durante los meses de invierno de 2008 se registraron heladas, lo cual produjo una disminución significativa de la cobertura. En Junio de 2009 una población de aproximadamente 30 carpinchos (*Hydrochoerus hydrochaeris*) causó una depredación completa de las partes aéreas de las plantas y el wetland aparentó ser una laguna no vegetada. Sin embargo, las raíces y rizomas de *T. domingensis* no fueron dañados. En noviembre de 2009 se instaló un sistema perimetral simple para detener el ingreso de los animales. Posteriormente, las plantas mostraron una gran recuperación que fue favorecida por la estación de crecimiento, alcanzando una cobertura de 60% después de 30 días.

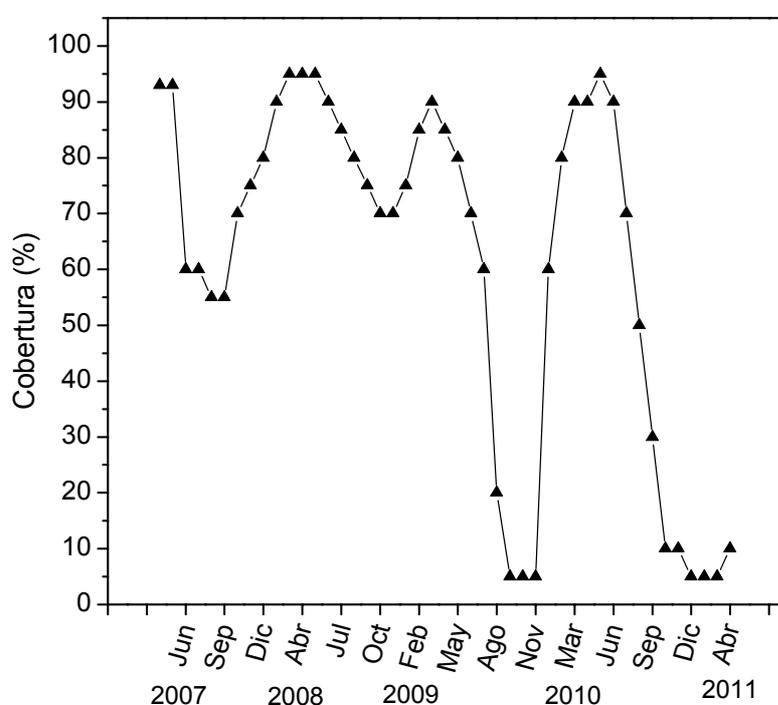


Fig. 3.1. Variación temporal de la cobertura vegetal en el humedal construido.

En Septiembre de 2010, la cobertura comenzó a declinar nuevamente porque los carpinchos lograban ingresar al humedal y alimentarse nuevamente de los brotes tiernos. En octubre de 2010 se realizó una extracción del sedimento de fondo a fin de extraer materia orgánica en descomposición. A partir de esta perturbación la cobertura disminuyó en forma sostenida hasta llegar al 10%. Desde el mes de Febrero de 2011 se trabajó para mejorar el sistema colocando un nuevo cerco perimetral para alejar a los animales. La vegetación comenzó a recuperarse lentamente en Abril. Es de esperar que alcance una cobertura

adecuada en poco tiempo, tal como se observó en el evento de depredación antes mencionado.

3.3.2. Eficiencia del wetland construido en la etapa de depredación de carpinchos:

La Tabla 3.2 muestra la eficiencia del sistema en la retención de contaminantes en un periodo donde operó en condiciones normales (Abril 2007-Mayo 2009), comparándola con el periodo donde el wetland funcionó sin la parte aérea de las macrófitas enraizadas (Jun. 2009-Nov. 2009) y el periodo de recuperación posterior (Dic. 2009-Sept. 2010).

Tabla 3.2. Concentraciones medias de los parámetros medidos en agua en la entrada y salida y remoción estimada durante los periodos estudiados. Las concentraciones están expresadas en mg L⁻¹.

Período Parámetro	Normal Previo			Vegetación sin parte aérea			Recuperación Posterior		
	Entrada	Salida	Remoc. (%)	Entrada	Salida	Remoc. (%)	Entrada	Salida	Remoc. (%)
Temperatura (° C)	21,0	18,7	--	21,3	18,7	--	19,5	17,6	--
OD (mg L ⁻¹)	1,74	1,30	--	2,93	1,79	--	3,40	2,12	--
Conductividad (umho cm ⁻¹)	5177,8	2572,5	--	6450,7	2242,5	--	5113,3	1955,6	--
pH	10,61	8,01	--	10,91	8,01	--	10,82	8,32	--
NO ₃ ⁻	45,2	9,31	79,9	59,5	9,54	84,0	50,6	9,92	80,4
NO ₂ ⁻	3,935	0,061	93,1	1,183	0,078	93,4	2,221	0,352	84,1
NH ₄ ⁺	2,79	2,43	13,4	2,12	1,94	8,5	0,88	0,77	11,8
PT	0,362	0,303	22,5	0,514	0,379	26,4	0,396	0,309	22,0
PRS	0,082	0,068	12,5	0,104	0,093	10,6	0,030	0,026	13,3
SO ₄ ²⁻	1792,4	767,6	56,2	2380,1	736,5	69,0	1872,9	626,4	66,5
Alcalinidad	710,0	288,5	57,2	327,7	263,2	19,7	353,2	224,1	36,5
Ca ²⁺	219,6	81,3	61,7	252,1	93,2	63,4	136,1	47,5	65,1
Fe	13,391	0,307	97,6	1,051	0,095	91,0	0,824	0,087	89,4
Cr	0,062	0,011	76,6	0,041	0,011	73,2	0,092	0,014	84,7
Ni	0,065	0,019	66,8	0,025	0,012	52,0	0,041	0,020	51,2
Zn	0,035	0,020	49,9	0,019	0,012	36,8	0,038	0,023	39,5
DBO	149,7	26,4	76,2	34,1	24,5	28,2	21,3	10,0	53,2
DQO	396,2	78,3	73,3	88,6	52,4	40,9	85,0	47,1	44,6

Si bien durante todo el periodo estudiado las eficiencias de retención de contaminantes fueron satisfactorias, en la primera etapa (operación normal) se observaron las mejores eficiencias para la mayoría de los parámetros. Entre los dos últimos periodos no hubo diferencias significativas en los porcentajes de remoción, salvo en el caso de la DBO, que mostró menores eficiencias de retención en el periodo sin parte aérea. Amonio, PRS y PT no fueron eficientemente removidos durante los diferentes periodos, probablemente debido a las

bajas concentraciones de OD que normalmente se produjeron en el wetland, llegando a la anoxia en algunos muestreos. La disminución de las concentraciones de alcalinidad y el Ca^{2+} sugieren la precipitación de carbonato de calcio. NO_3^- y NO_2^- probablemente fueron removidos por desnitrificación. La disminución de Fe y SO_4^{2-} y los bajos valores de oxígeno sugieren la formación de sulfuro de hierro que precipita al sedimento de fondo. Cr, Ni y Zn fueron eficientemente retenidos.

A lo largo del estudio, las concentraciones de Cr, Ni, Zn y PT fueron significativamente mayores en el sedimento de entrada que en el de salida (Tabla 3.3) demostrando que fueron eficientemente retenidos en el wetland. Las concentraciones en sedimento de los metales estudiados presentaron valores significativamente más altos durante período sin parte aérea en la zona de entrada.

Tabla 3.3. Concentraciones medias, mínimas y máximas de los parámetros medidos en sedimento a la entrada y a la salida del wetland durante los 3 periodos.

Período	Normal Previo			Vegetación sin parte aérea			Recuperación Posterior		
	Media	Min	Max	Media	Min	Max	Media	Min	Max
P ent	1,033	0,500	2,821	0,886	0,735	1,071	1,073	0,683	1,232
P sal	0,390	0,292	0,944	0,362	0,315	0,407	0,377	0,309	0,445
Cr ent	1,074	0,145	3,312	1,289	0,383	3,812	0,804	0,327	1,223
Cr sal	0,054	0,016	0,175	0,035	0,020	0,062	0,037	0,022	0,081
Ni ent	0,551	0,062	1,223	0,865	0,201	2,746	0,504	0,234	0,708
Ni sal	0,058	0,024	0,111	0,041	0,031	0,054	0,037	0,025	0,063
Zn ent	0,090	0,030	0,213	0,086	0,026	0,182	0,071	0,028	0,129
Zn sal	0,063	0,048	0,078	0,053	0,042	0,067	0,061	0,051	0,072

Tabla 3.4. Concentraciones medias, mínimas y máximas de los parámetros medidos en hoja y raíz de *T. domingensis* durante los 3 periodos.

Período	Normal Previo			Vegetación sin parte aérea			Recuperación Posterior		
	Media	Min	Max	Media	Min	Max	Media	Min	Max
P hoja	2,112	0,787	3,483	-	-	-	2,598	1,822	3,542
P raíz	1,999	0,812	4,372	1,498	1,046	1,863	2,466	1,812	4,332
Cr hoja	0,038	0,003	0,285	-	-	-	0,023	0,010	0,079
Cr raíz	0,422	0,064	1,973	0,520	0,215	1,274	0,795	0,401	1,632
Ni hoja	0,021	0,001	0,129	-	-	-	0,017	0,004	0,053
Ni raíz	0,308	0,070	1,144	0,525	0,217	1,323	0,527	0,202	1,064
Zn hoja	0,028	0,006	0,068	-	-	-	0,053	0,015	0,161
Zn raíz	0,099	0,045	0,319	0,096	0,062	0,323	0,109	0,068	0,307

Durante todo el estudio, las concentraciones de metales fueron mayores en raíces que en parte aérea, sugiriendo escasa traslocación (Tabla 3.4). Se determinaron altas concentraciones de Cr, Ni y Zn en raíces durante el período con las plantas sin parte aérea y el período de recuperación posterior. Kadlec y Wallace (2009) y Vymazal y Kröpfelová (2005) propusieron que la eficiencia del wetland aumenta cuando el sistema raíz-rizoma de la vegetación llega a su madurez, lo cual ocurre entre 3 y 5 años. En el presente caso, el sistema probablemente continuó funcionando eficientemente y pudo recuperarse debido a que ya había alcanzado su etapa de madurez. Las concentraciones en hojas en la etapa de recuperación posterior no mostraron aumento significativo respecto a la primera etapa.

3.3.3. Eficiencia del Wetland

En la Tabla 3.5 se presentan los parámetros físico-químicos del agua del humedal natural donde se estudió a *T. domingensis*. Las concentraciones de Cr, Ni y Zn se encontraron por debajo de los límites de detección del método utilizado. Por su parte, dichas concentraciones en el sedimento también se encontraron por debajo de los límites de detección y, para el caso del PT se determinó una concentración media de $0,119 \pm 0,010 \text{ mg g}^{-1}$.

En la mayoría de los parámetros medidos se registró una alta eficiencia de remoción por parte del humedal. Las concentraciones de los parámetros medidos en el efluente del humedal se encontraron por debajo de los niveles guía para aguas de desecho industriales que exige la Ley provincial 1089/82.

3.3.4. Acumulación de contaminantes en tejidos vegetales y en sedimento

En la mayoría de los muestreos, se observaron mayores concentraciones de PT en las partes aéreas de *T. domingensis* en comparación con las partes subterráneas (Fig. 3.2). Las concentraciones de PT en las plantas del humedal construido variaron permanentemente. Durante todos los muestreos se registraron mayores concentraciones de Cr, Ni y Zn en las partes subterráneas en comparación con las hojas (Fig. 3.2). El Zn presentó las menores concentraciones en tejidos vegetales a lo largo del estudio, en comparación con los otros metales. Debido a que los carpinchos comieron las partes aéreas de las plantas del humedal durante el año 2009 y 2010 no se pudo tomar muestras vegetales para su análisis en el

período 2011, debido a esto no se muestran resultados en las figuras de concentración de PT, Cr, Ni y Zn (Fig. 3.2),

Las concentraciones de PT fueron significativamente mayores en los sedimentos de la zona de entrada al humedal en comparación con los de la zona de salida. En la Fig. 3.3 se muestran dichas concentraciones. Para los tres metales las concentraciones en el sedimento de la entrada mostraron valores significativamente superiores que las concentraciones determinadas en el sedimento de la salida (Fig. 3.3).

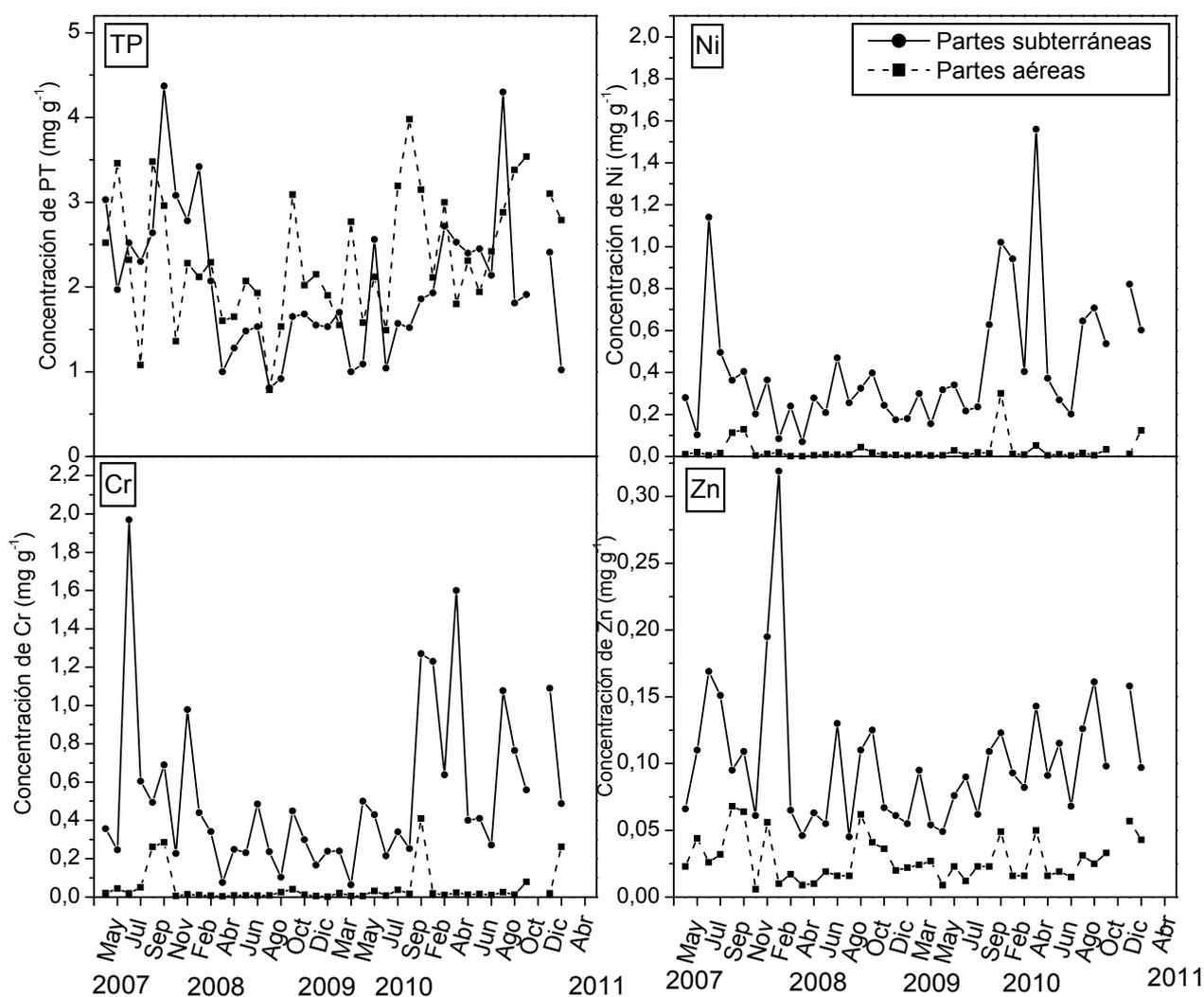


Fig. 3.2. Concentración de PT, Cr, Ni y Zn en partes aéreas y subterráneas (rizomas y raíces) de plantas de *T. domingensis* en el humedal construido.

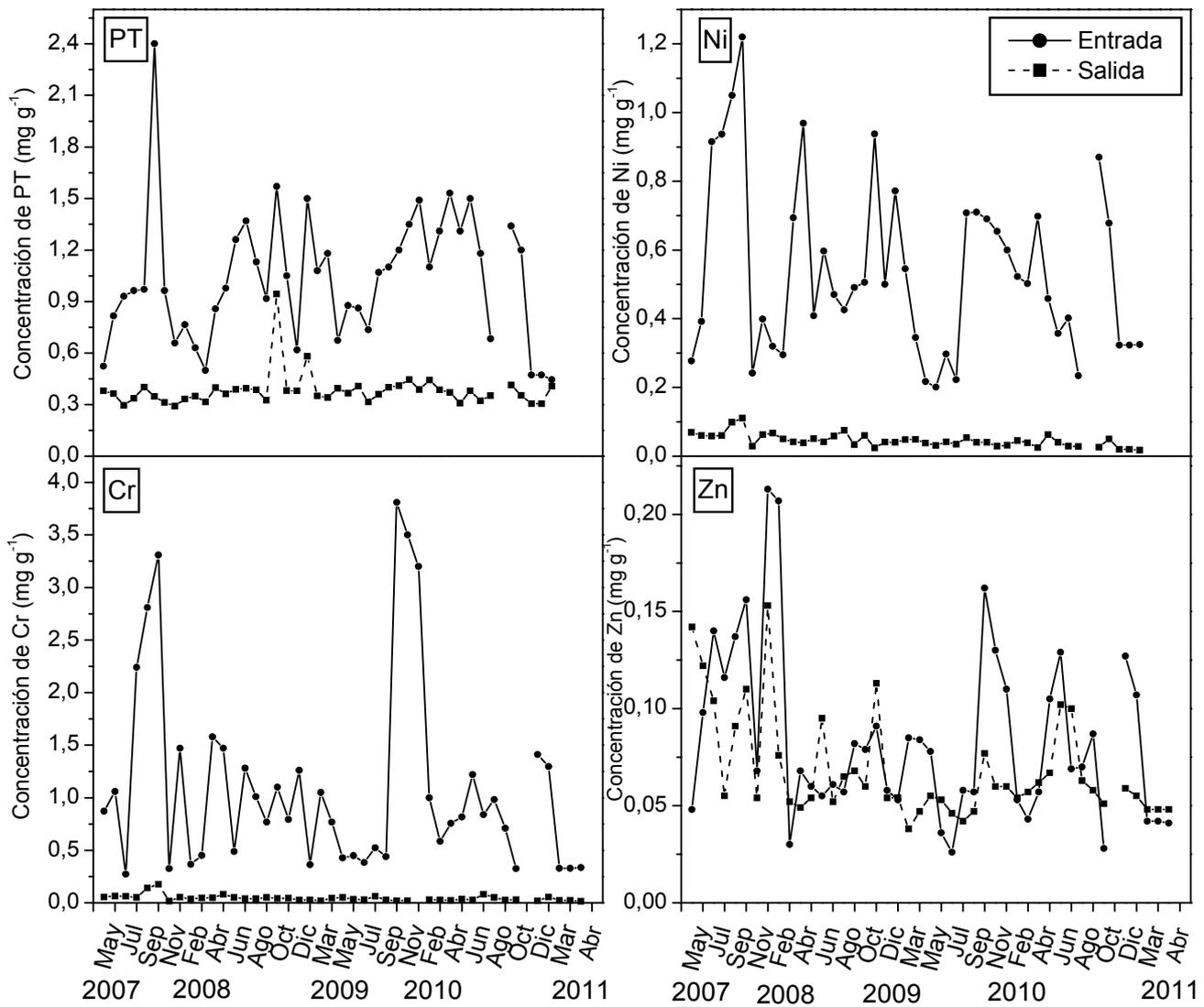


Fig. 3.3. Concentración de PT, Cr, Ni y Zn en el sedimento de la zona de entrada y de salida del humedal construido.

Tabla 3.5. Parámetros físico-químicos medidos en el agua del humedal natural donde se estudió a *T. domingensis* durante el período de estudio del humedal construido (ND = no detectado, los valores entre paréntesis corresponden a los límites de detección del método).

Parámetro	<i>T. domingensis</i>	
	Media	Mín./Máx.
Temperatura (°C)	17,6	10,5/26,0
Conductividad (uS cm ⁻¹)	210	180/220
pH	7,01	6,7/7,3
OD (mg L ⁻¹)	6,52	5,7/7,1
Sól. Tot. Dis. (mg L ⁻¹)	132,0	114,0/147,0
Ca (mg L ⁻¹)	25,5	23,0/28,0
Na (mg L ⁻¹)	35,2	31,1/38,5
K (mg L ⁻¹)	11,9	10,2/13,0
Mg (mg L ⁻¹)	7,35	5,1/9,4
Carbonato	ND (0,5)	-
Bicarbonato (mg L ⁻¹)	80,6	63,5/95,7
Alcalinidad Total	66,1	54,2/78,4
Sulfato (mg L ⁻¹)	15,8	13,0/18,9
Nitrato (mg L ⁻¹)	1,7	1,5/1,9
Nitrito (mg L ⁻¹)	ND (0,005)	-
Amonio (mg L ⁻¹)	0,990	0,850/1,15
PRS (mg L ⁻¹)	0,059	0,040/0,079
PT (mg L ⁻¹)	0,584	0,530/0,610
Fe (mg L ⁻¹)	3,993	3,42/4,60
Cr (mg L ⁻¹)	ND (0,001)	-
Ni (mg L ⁻¹)	ND (0,003)	-
Zn (mg L ⁻¹)	ND (0,025)	-

3.3.5. Estudio de la vegetación

Las concentraciones de metales en plantas, la variación en la altura de plantas (Fig. 3.4), la densidad de las plantas (Fig. 3.5), la concentración de clorofila (Fig. 3.6) y el peso seco (Fig. 3.7) se midieron desde abril del 2007 hasta Agosto del 2010 ya que durante el 2011 la cobertura vegetal fue muy baja debido al disturbio causado por los carpinchos.

Las plantas del humedal construido mostraron mayor altura que las del ambiente natural y no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas de la zona de entrada y de la zona de salida (Fig. 3.4). Se observaron cambios a lo largo del tiempo, los cuales siguieron un patrón estacional, mostrando menores valores de altura de

plantas durante los meses de otoño e invierno. En la mayoría de los muestreos, la densidad de *T. domingensis* fue significativamente superior que la registrada en el ambiente natural (Fig. 3.5).

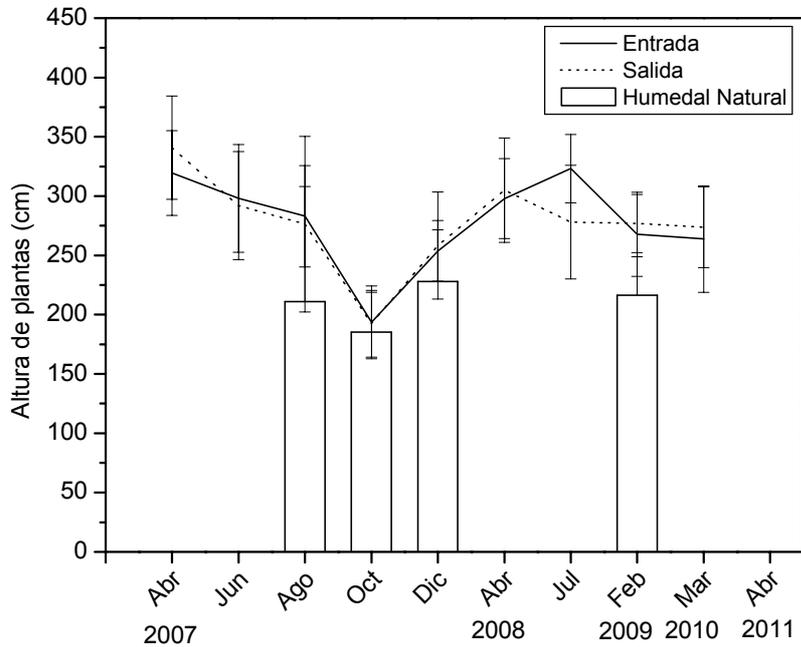


Fig. 3.4. Variación en la altura de las plantas de la entrada y salida del humedal construido y en las plantas del humedal natural.

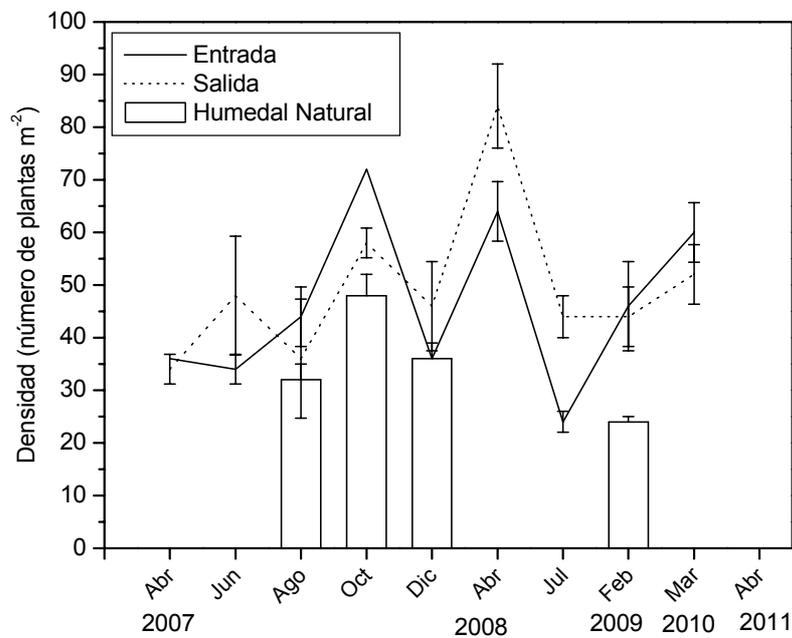


Fig. 3.5. Variación en la densidad de las plantas de la entrada y salida del humedal construido y en las plantas del humedal natural.

Las concentraciones de clorofila registradas durante el período de estudio no mostraron una tendencia concreta a lo largo del tiempo. En muchos muestreos, *T. domingensis* mostró mayores concentraciones de clorofila en comparación con las plantas del humedal natural (Fig. 3.6).

En la biomasa aérea de *T. domingensis* existieron diferencias significativas entre las plantas de *T. domingensis* del humedal construido y las del humedal natural (Fig. 3.7) y, en algunos muestreos, las plantas de la zona de salida mostraron una biomasa aérea mayor que la de las plantas del humedal natural (Junio de 2007 y Abril de 2008).

Con respecto a los cambios en la morfología radicular interna, durante los años 2007 y 2008 se observó una tendencia estacional en el ATR de las plantas de la zona de entrada alcanzando mayores valores durante los meses de primavera y verano (Fig. 3.8). Posteriormente, en las plantas de la entrada se tomó una muestra en verano de 2009 y en invierno de 2010, observándose un valor significativamente superior en verano de 2009. El ATM de las plantas de la entrada y de salida mostró un patrón similar el del ATR (Fig. 3.9). Tanto el ATR como el ATM medidos en las plantas del humedal natural no mostraron una tendencia definida, al igual que el ATV (Fig. 3.10). El NV en las plantas de la entrada mostró una tendencia cíclica alcanzando mayores valores durante los meses de junio de 2007 y marzo de 2008 (Fig. 3.11).

En agosto del 2010 solo se pudieron analizar raíces de la salida del humedal construido y raíces de plantas del humedal natural, ya que las raíces de la entrada del wetland construido no estaban en condiciones para realizar cortes histológicos. En el año 2011 no se tomaron muestras de raíces de las plantas del humedal construido para analizar los parámetros morfométricos internos de la raíz debido al efecto adverso provocado por la predación de los carpinchos antes mencionado.

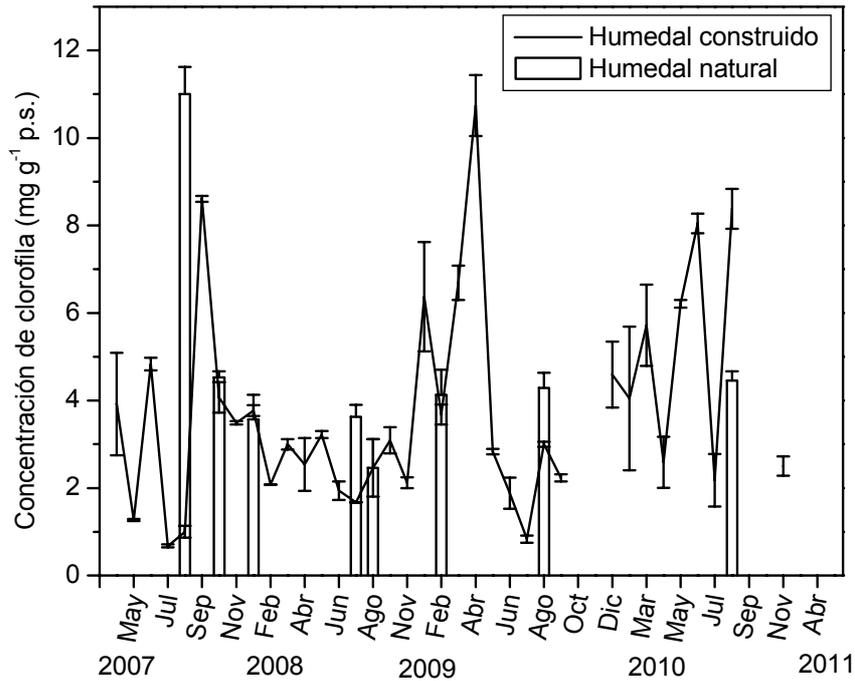


Fig. 3.6. Variación en la concentración de clorofila de las plantas de la entrada y salida del humedal construido y en las plantas del humedal natural.

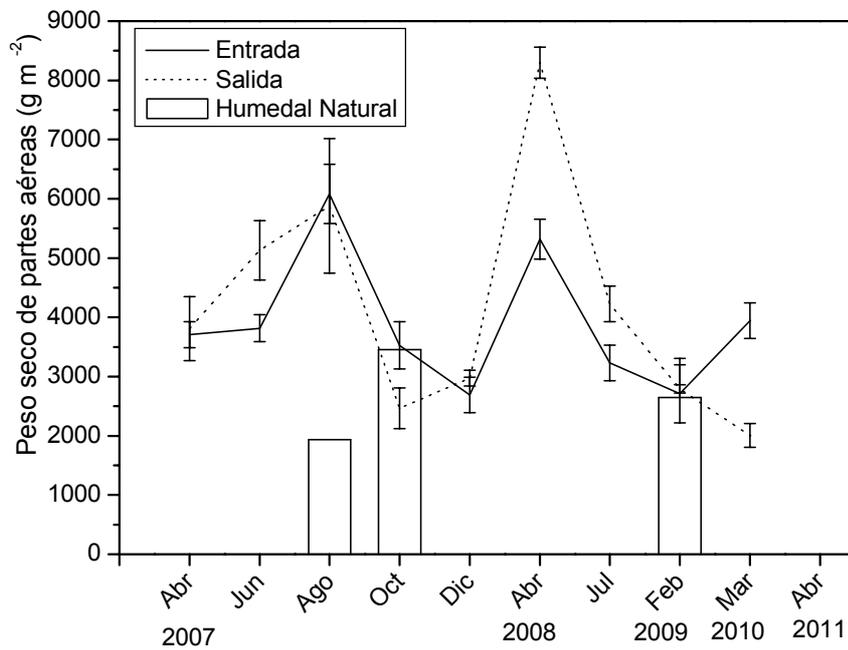


Fig. 3.7. Variación en el peso seco de las plantas de la entrada y salida del humedal construido y en las plantas del humedal natural.

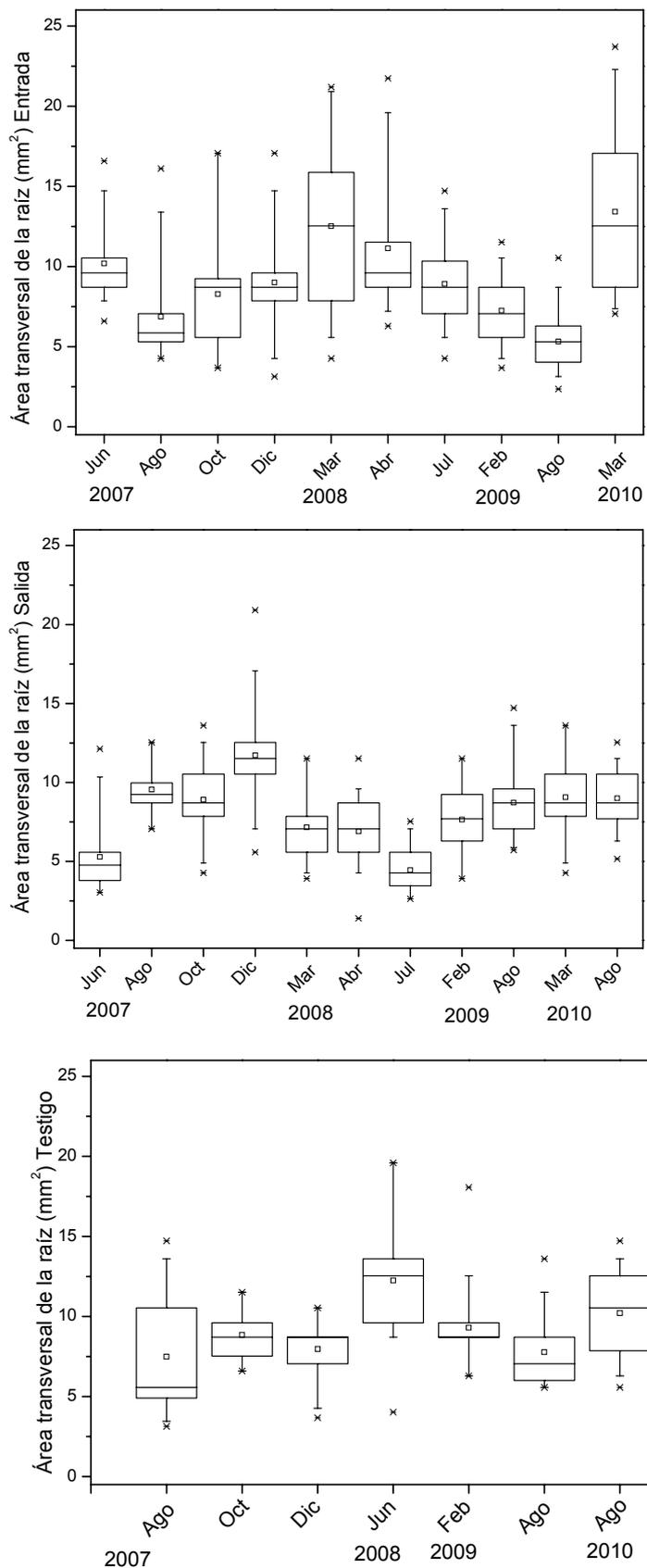
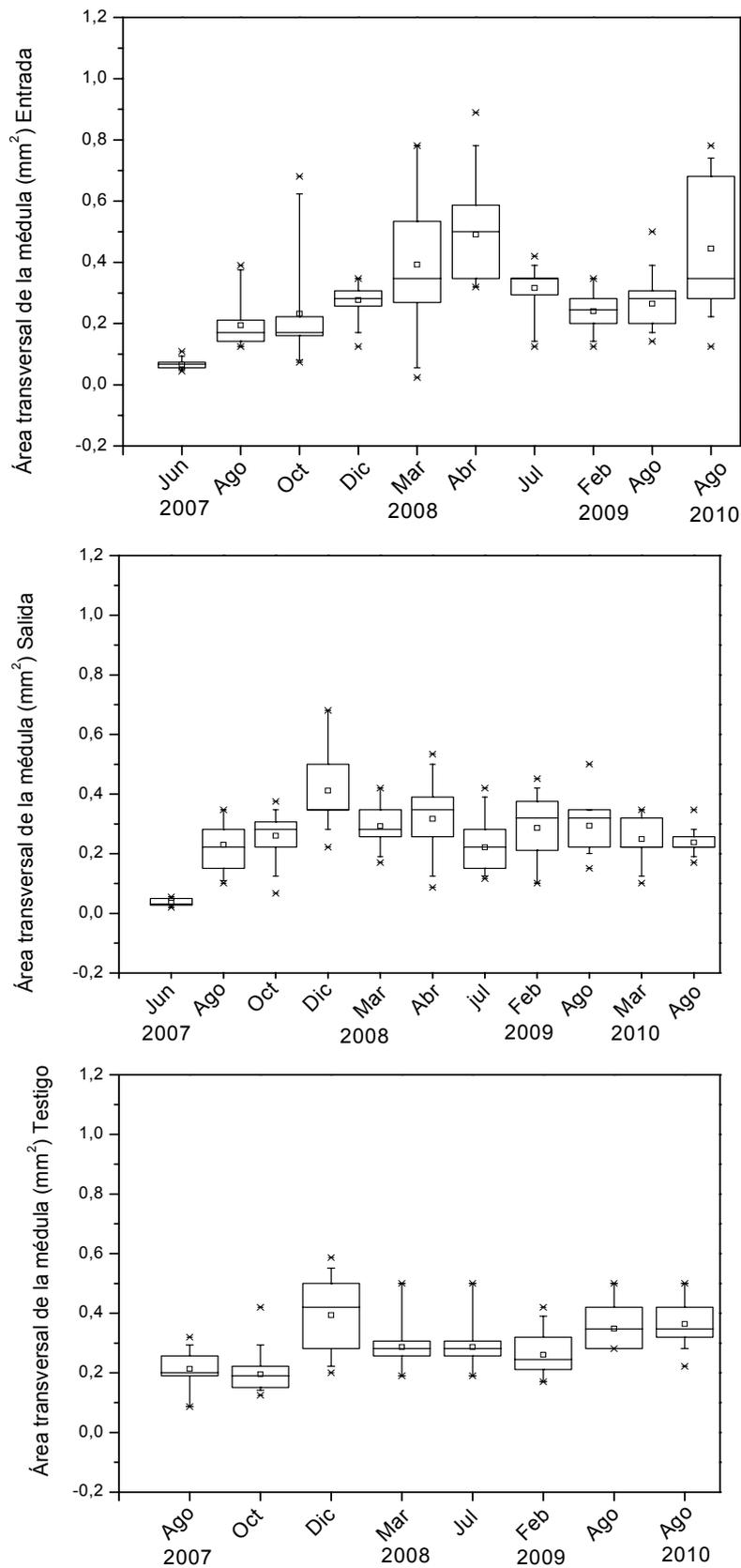
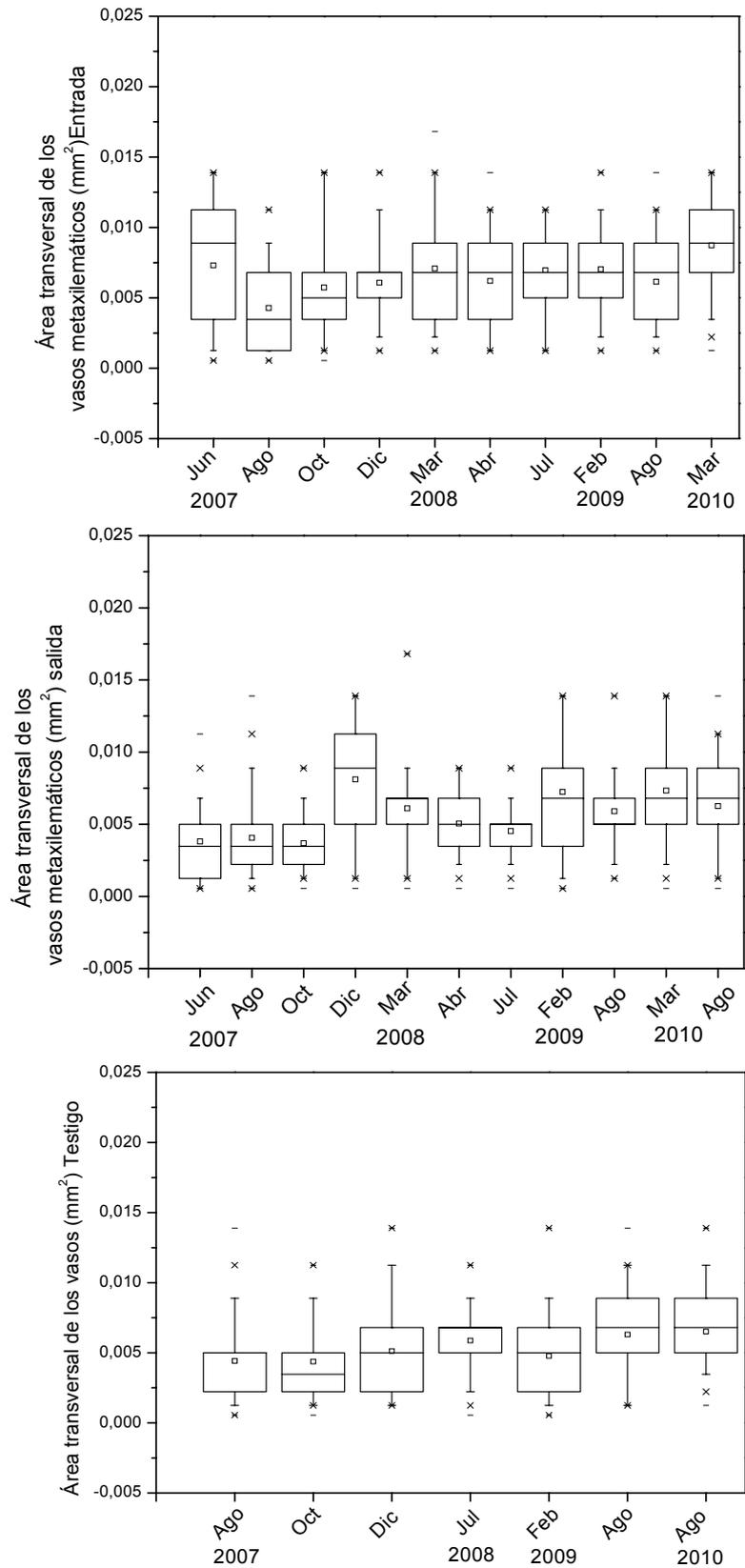


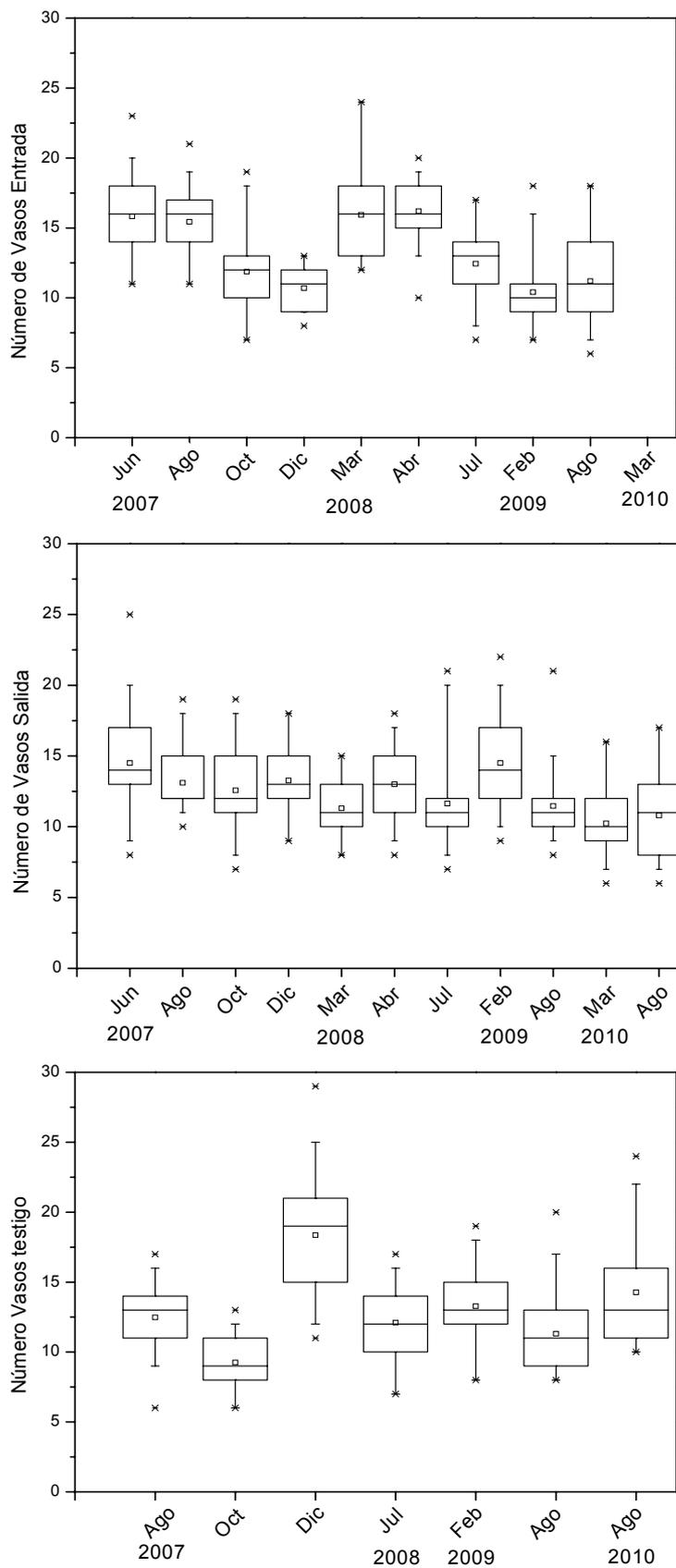
Fig. 3.8. Variación en el ATR de las plantas de la entrada y salida del humedal construido y en las plantas del humedal natural.



3.9. Variación en el ATM de las plantas de la entrada y salida del humedal construido y en las plantas del humedal natural.



3.10. Variación en el ATV de las plantas de la entrada y salida del humedal construido y en las plantas del humedal natural.



3.11. Variación en el NV de las plantas de la entrada y salida del humedal construido y en las plantas del humedal natural.

3.4. Discusión del capítulo

En períodos anteriores a la realización de mi trabajo de tesis se evaluó la eficiencia del humedal la cual se determinó analizando la composición química del efluente a la entrada y salida, determinándose Cr, Ni, Zn, Fe, P, N, DQO, DBO, etc durante 4 años. Se desarrollaron tres etapas sucesivas de dominancia de vegetación: 1. Dominancia de *Eichhornia crassipes*, 2. Dominancia mixta de *E. crassipes* y *Typha domingensis*, 3. Dominancia de *T. domingensis*. Durante la primera etapa, las macrófitas fueron las principales responsables de la remoción de contaminantes. Durante la última etapa se observó un aumento significativo de la concentración de metales y nutrientes en el sedimento, siendo la precipitación al sedimento el principal mecanismo de eliminación de contaminantes del agua. En el período intermedio tanto sedimento de fondo como macrófitas fueron los encargados de la remoción. Sin embargo, las eficiencias de remoción de los diferentes parámetros estudiados no mostraron diferencias significativas entre las distintas etapas de dominancia de vegetación, salvo para PO_4^{3-} y NH_4^+ que presentaron eficiencias significativamente superiores en la segunda y la tercera etapa con respecto a la primera. Las eficiencias de remoción fueron 49,0-66,5% para Cr, 48,1-73,0% Ni, 64,8-82,4% Fe, 61,7-86,1% NO_3^- , 62,0-86,4% NO_2^- . DBO y DQO disminuyeron en un 55,0-67,8% y 54,4-68,3, respectivamente (Maine et al., 2007). Las tendencias en la dominancia de la vegetación y en las eficiencias de remoción siguieron el mismo patrón que lo que se observó en el wetland a escala piloto que se construyó previamente.

Durante el período informado en esta tesis, el humedal fue eficiente en la remoción de metales, a pesar de los eventos temporales de depredación de las plantas del wetland. Otros autores informan elevadas eficiencias de remoción de metales en humedales naturales y construidos (Ellis et al., 1994; Vesik y Allaway, 1997; Pontier et al., 2004; Vymazal, 2011). Beining y Otte (1997) encontraron que un efluente de escorrentía de una mina disminuyó en un 95% su concentración de Zn luego de atravesar un humedal natural. Tanto en el afluente como en el efluente del humedal, la concentración de Zn se encontró por debajo de $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ durante todo el período estudiado. No obstante, se registró un aumento del Zn en sedimentos y biomasa vegetal indicando que el humedal es eficiente en la retención del mismo.

Los porcentajes de disminución de DQO y DBO obtenidos en el humedal construido fueron similares a los informados por la bibliografía. Diversos autores informan porcentajes de remoción de DQO y DBO de 76% y 88% (Jenssen et al., 1993), 87% y 90% (Gómez

Cerezo et al., 2001), 90% y 90% (Merlin et al., 2002), 60% y 61% (Ansola et al., 2003), 73% y 58% (Calheiros et al., 2007). Song et al. (2006) estimaron una remoción media de 62% y 70% de DQO y DBO durante seis años de operación de un sistema de humedales de flujo subsuperficial.

Debido a la carencia de oxígeno, la desnitrificación fue probablemente el principal proceso de remoción de nitrógeno. Los resultados obtenidos son consistentes con numerosas referencias bibliográficas que muestran la importancia de la desnitrificación en la remoción de nitrógeno en humedales, tanto naturales como construidos (Golterman et al., 1988; Minzoni et al., 1988; Reddy et al., 1989; D'Angelo y Reddy, 1993; Matheson et al., 2002).

En cuanto al P, se observó un mayor número de muestreos donde las partes aéreas mostraron concentraciones significativamente superiores que las registradas en las partes subterráneas. Esto concuerda con resultados de otros estudios de *T. domingensis* realizados en humedales naturales y construidos (Hadad et al., 2006; Hadad et al., 2007). Las hojas de las macrófitas poseen eficientes rutas de transferencia de nutrientes hacia las células fotosintéticas (Barnabas, 1988). Este hecho explicaría la mayor acumulación de P en las partes aéreas en comparación con la registrada en las partes subterráneas.

Los macronutrientes como el P son tomados rápidamente por las raíces y luego translocados hacia las partes aéreas para llevar a cabo la fotosíntesis, mientras que los elementos tóxicos tales como el Cr, Ni y Zn son tomados rápidamente y retenidos en el sistema radicular (Maine et al., 2004; Hadad et al., 2007; Suñé et al., 2007). La unión de los iones metálicos cargados positivamente a las cargas negativas de las paredes celulares de las raíces o la quelación a fitoquelatinas seguida de acumulación en vacuolas han sido reportados como mecanismos para reducir el transporte de metales hacia las partes aéreas (Göthberg et al., 2004) y así incrementar la tolerancia de las plantas (Poschenrieder et al., 2006). Algunas especies de plantas han desarrollado estrategias para evitar la acumulación de concentraciones tóxicas de metales en los sitios sensibles dentro de las células. Si los metales son absorbidos por las plantas, pueden ser almacenados lejos de los compartimientos metabólicamente activos, evitando así los efectos fitotóxicos (Memon et al., 2001).

Las especies de macrófitas difieren ampliamente en su habilidad para acumular metales. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que las concentraciones de metales en tejidos vegetales y sedimento podrían ser ordenadas en el orden decreciente Cr > Ni > Zn, probablemente debido a las concentraciones del efluente. De la misma manera, la acumulación de metales entre los diferentes compartimientos podría ordenarse como: sedimento > raíces > hojas. Los tejidos de las partes subterráneas mostraron concentraciones

significativamente mayores de metales que las hojas. Similares resultados fueron observados para especies emergentes (Taylor y Crowder, 1983; Satyakala y Kaiser, 1997; Keller et al., 1998; Deng et al., 2004; Carranza-Álvarez et al., 2008) y para especies flotantes libres (Banerjee y Sarker, 1997; Hadad et al., 2007, 2011). Tal como se explicó en el Capítulo II, una mayor acumulación de metales en raíces de macrófitas en comparación con la acumulación en hojas, es un hecho ampliamente comprobado. Sin embargo, frente a una exposición a elevadas concentraciones de metales en los experimentos de invernadero se observó una translocación significativa hacia las partes aéreas de *T. domingensis* (Capítulo II), aunque no se superaron las concentraciones que se determinaron en las partes subterráneas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las concentraciones elevadas que se utilizaron en dichos experimentos normalmente no se registran en humedales construidos, por lo que las plantas tendrían un amplio rango de tolerancia a metales si se las utiliza en este tipo de tratamiento.

Según Kabata-Pendias y Pendias (2000), un rango de concentraciones de Zn comprendido entre 0,070 y 0,40 mg g⁻¹ podría considerarse tóxico para plantas, mientras que el nivel de Zn tóxico en tejidos vegetales es de 0,230 mg g⁻¹ (Borkert et al., 1998). Comparando con las concentraciones de Zn obtenidas en las plantas de la entrada, Ellis et al. (1994) registraron una concentración de un orden de magnitud mayor en raíces de *T. latifolia* (0,70 mg g⁻¹ p. s.) en un humedal natural en Londres utilizado para el tratamiento de aguas de escorrentía. Gibson y Pollard (1988), Fakayode y Onianwa (2002) y Cardwell et al. (2002) observaron un crecimiento positivo de macrófitas cultivadas con sedimento con concentraciones de Zn de 16 mg g⁻¹, 0,30 mg g⁻¹ y 0,51 mg g⁻¹, respectivamente. Manios et al. (2003) comparó las concentraciones de clorofila en plantas de *T. latifolia* expuestas a mezclas de metales de concentraciones crecientes, informando un daño sobre los vegetales a un nivel umbral de una mezcla de Cd, Cu, Ni, Pb y Zn de 4, 80, 40, 40 y 80 mg L⁻¹, respectivamente. En ese trabajo, la concentración de Zn en tejidos fue de 0,392 mg g⁻¹ en raíces y de 0,061 mg g⁻¹ en hojas. Ambas concentraciones fueron mucho mayores que las registradas en las plantas de la zona de entrada del humedal construido. Por otro lado, las concentraciones de Ni en tejidos alcanzaron valores de 0,550 mg g⁻¹ en raíces y 0,028 mg g⁻¹ en hojas, siendo éstas levemente inferiores que las registradas en las plantas de la entrada. El Zn presentó similares concentraciones entre partes subterráneas y el sedimento. Las concentraciones de metales en sedimento y tejidos vegetales determinadas a la entrada del humedal construido son comparativamente inferiores con los umbrales de tolerancia vegetal informados en la literatura.

Aunque una baja producción de biomasa es típicamente observada en humedales naturales durante el invierno, las plantas de *T. domingensis* del humedal construido mostraron una menor senescencia estacional y una mayor altura y densidad en comparación con el humedal natural. Esto podría explicarse porque el efluente fue rico en nutrientes. Frente a un aumento de nutrientes las plantas producen un crecimiento de partes aéreas proporcionalmente mayor (Reddy y Sutton, 1984; Lallana y Kieffer, 1988; Neiff et al., 2001; Hadad y Maine, 2007; Maddison et al., 2009). Contrariamente al aumento de la biomasa, la concentración de clorofila fue menor que la determinada en las plantas del humedal natural en varios muestreos. La concentración de este pigmento es un mejor indicador de la toxicidad del efluente que la biomasa seca. Varios autores reportaron que la concentración de clorofila en macrófitas es un buen indicador de toxicidad para diferentes metales (Chaney, 1993; Burton et al., 2004; Kolotov et al., 2004; Mufarrege et al., 2010; Hadad et al., 2007, 2011). Sin embargo, las respuestas dependen de las diferentes especies de macrófitas. Manios et al. (2003) observaron un incremento en la hidrólisis de clorofila debido a la acumulación de Ni, Zn, Cd, Cu y Pb en *Typha latifolia*. Maine et al. (2004) reportaron que la concentración de clorofila de *P. stratiotes* disminuyó al ser expuesta a concentraciones de Cr en agua mayores a 1 mg L^{-1} , mientras que *Salvinia herzogii* no mostró cambios significativos en la concentración de clorofila al ser expuesta hasta concentraciones de 6 mg Cr l^{-1} . Por otro lado Xu et al. (2011) estudiaron la tolerancia de *T. angustifolia* a efluentes con diferentes niveles de DQO y observaron que la concentración de clorofila disminuía a 600 y 800 mg L^{-1} de DQO.

T. domingensis mostró una alta biomasa, indicando su tolerancia a los contaminantes del efluente tratado en el humedal construido. Otras respuestas al efluente incluyen los cambios adaptativos en la estructura de las raíces. Las plantas de la zona de entrada mostraron las más altas ATR, lo cual coincide con lo reportado por Ciro et al. (1999) y Xie y Yu (2003), quienes observaron una disminución en el ATR como una adaptación a ambientes acuáticos con baja disponibilidad de nutrientes.

Campanella et al. (2005) observaron un incremento en el ATR y ATM en plantas de *E. crassipes* expuestas a un efluente cloacal en el mismo humedal construido durante su primera etapa de operación. Los nutrientes contenidos en el efluente actúan como señales que pueden disparar mecanismos moleculares, los cuales modifican los procesos de división celular y diferenciación dentro de las raíces (Wahl et al., 2001). Estos procesos tienen un significativo impacto sobre la estructura radicular. A su vez, las respuestas de la morfología de raíces a los nutrientes pueden ser modificadas por reguladores del crecimiento vegetativo,

tales como auxinas y citoquininas, sugiriendo que el control del desarrollo radicular podría ser mediado por cambios en la síntesis y transporte de hormonas cuando las plantas son expuestas a cambios en las concentraciones de nutrientes en el ambiente (López-Bucio et al., 2003). El mantenimiento del meristema radicular es disturbado por factores fisiológicos y moleculares como respuesta a diferentes concentraciones de P (Desnos, 2008). Mufarrege et al. (2010) evaluaron los efectos de los contaminantes contenidos en el efluente tratado en el humedal construido sobre la macrófita flotante *P. stratiotes* y observó que el Ni mostró el mayor efecto tóxico en términos de la disminución de los parámetros anatómicos radiculares. En la presente tesis, las plantas que se encontraban en la zona de entrada del humedal construido mostraron un aumento de los parámetros radiculares internos como respuesta a la toxicidad del efluente tratado. Los cambios morfológicos permitieron un aumento en la eficiencia de la acumulación de los contaminantes en tejidos subterráneos. Wahl y Ryser (2001) demostraron que un aumento en el ATR y ATV tiene una influencia positiva sobre la conductancia hidráulica de las raíces. Cuando las concentraciones de los contaminantes aumentan, las raíces gruesas son una respuesta adaptativa para incrementar la toma y acumulación de contaminantes (Ciro et al., 1999; Xie y Yu, 2003).

Debido a que la masa total de sedimento es mayor que la de la biomasa vegetal, el sedimento se convierte en el principal compartimiento de acumulación de metales en sistemas acuáticos. Como se determinó, el sedimento aumenta su capacidad de retención de contaminantes si la cobertura vegetal disminuye manteniendo la capacidad de retención del sistema. Estos resultados coinciden con estudios previos (Panigatti y Maine, 2003). Sin embargo, la ventaja de utilizar macrófitas es la posibilidad que tienen de ser cosechadas, logrando la remoción completa del contaminante del sistema. La alta productividad de las macrófitas y capacidad de acumulación de metales permitirían alcanzar importantes tasas de remoción de contaminantes en corto tiempo. Las macrófitas emergentes juegan un rol importante en mantener condiciones óxicas del sedimento por el transporte de oxígeno desde las partes aéreas hacia las subterráneas (Armstrong, 1978), influenciando la diversidad de microorganismos y afectando el ciclo biogeoquímico del sedimento (Barko et al., 1991; Sorrel y Boon, 1992).

En las experiencias de invernadero se planteó trabajar con altas concentraciones de metales y nutrientes ya que en el humedal construido las concentraciones de metales que se determinaron en agua, sedimento y tejidos vegetales fueron comparativamente bajas. Así, se buscó establecer la respuesta de *T. domingensis* intentando determinar los valores umbrales

de toxicidad para la especie a fin de ampliar los conocimientos acerca de su utilidad en humedales construidos por ser una especie comúnmente usada en esos sistemas.

3.5. Consideraciones finales

T. domingensis demostró excelente respuesta en términos de crecimiento y propagación después del evento excepcional de depredación por carpinchos. En consecuencia, el período sin parte aérea fue acotado a unos pocos meses y el sistema se pudo recuperar. Es importante destacar que el wetland continuó reteniendo contaminantes durante este evento de depredación accidental y durante la etapa de recuperación posterior. Las plantas continuaron con la retención de metales en sus raíces y el sedimento aumentó la retención de contaminantes, equilibrando el funcionamiento del sistema. Esto ocurrió probablemente porque el sistema radicular ya había alcanzado su madurez. La bioacumulación de metales en parte aérea no es un factor clave dentro del mecanismo de retención, sin embargo la parte aérea transloca oxígeno a las raíces y sedimento, cumpliendo una importante función en el mecanismo de retención.

Durante el período de operación normal del wetland, la concentración de clorofila fue sensible a la toxicidad del efluente. Sin embargo, una mayor biomasa y altura de plantas en comparación con las registradas en el humedal natural, demostraron la adaptabilidad de *T. domingensis*. Las adaptaciones observadas permitieron a esta especie convertirse en la especie dominante y mantener una alta capacidad de retención de contaminantes en el humedal construido. En las plantas del wetland construido, la translocación de metales hacia las partes aéreas fue restringida, probablemente debido a las bajas concentraciones de metales registradas en el efluente, ya que éste es un tratamiento de pulido final. En consecuencia, la cosecha de las partes aéreas no sería un mecanismo efectivo de remoción de metales en humedales. Sin embargo, desde un punto de vista ecotoxicológico, esto podría ser una propiedad deseable ya que los metales no pasarían a las cadenas alimentarias a través de los herbívoros, evitando así riesgos para el ambiente.

Aunque las macrófitas son importantes acumuladoras de metales debido a su alta productividad y capacidad de retención de metales en sus raíces, el sedimento es un gran acumulador de metales que aumenta su capacidad de retención si la cobertura de las plantas disminuye regulando y manteniendo la capacidad de retención del sistema. El sedimento es el principal compartimiento de acumulación debido al hecho a que su masa total es mayor que la correspondiente a la biomasa vegetal en un área dada.

Capítulo 4

ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE HOJAS SECAS DE *T. domingensis* **COMO MATERIAL BIOSORBENTE**

4.1. Introducción:

La biosorción se define como la propiedad de ciertas biomoléculas de unirse y concentrar determinados iones u otras moléculas en soluciones acuosas. En contrapartida con el fenómeno de bioacumulación, el cual es más complejo ya que se basa en un transporte metabólico activo, la biosorción por biomasa seca es pasiva y se basa principalmente en la afinidad entre el biosorbente y el sorbato (Volesky, 2007). El uso de biomasa seca de diferentes especies de macrófitas como material biosorbente ha sido reportado por Dushenkov et al. (1995), Wang (1995), Schneider et al. (1995), Schneider y Rubio (1999), Miretzky et al. (2006), Suñé et al. (2007), Abdel-Ghani et al. (2009), etc. Las partes aéreas de las plantas del humedal construido (Capítulo 3) son periódicamente cosechadas para proceder a la limpieza del sistema y evitar que dicha biomasa, al secarse estacionalmente, contribuya a la acumulación de materia orgánica sobre el sedimento de fondo y así aumente la DBO (Karathanasis et al., 2003). Se observó que las hojas de las plantas del humedal construido no acumulan metales en gran medida, por lo que en el presente Capítulo se evaluó su utilidad después de ser cosechadas, como material biosorbente de metales. Se realizaron experimentos a escala de laboratorio donde se evaluaron los efectos del pretratamiento con ácido o álcali y se evaluó el efecto del tiempo de contacto, de la masa de biosorbente y del tamaño de partícula sobre la eficiencia de remoción en soluciones simples y multimetales.

4.2. Objetivo:

Analizar la remoción de Cr, Ni y Zn por hojas secas de *T. domingensis* de plantas provenientes del humedal construido, teniendo en cuenta diferentes tiempos de contacto, masas de biosorbente y tamaños de partícula.

4.3. Metodología:

Diseño Experimental:

Se cosecharon hojas de *T. domingensis* del humedal construido. Las hojas se lavaron con agua destilada, se secaron en estufa a 60 °C y luego se molieron. Se prepararon soluciones de Cr(III), Ni(II) y/o Zn(II) por dilución de soluciones estándares preparadas con Cr(NO₃)₃, NiCl₂ y Zn⁰. Las soluciones fueron ajustadas a pH 5,2 utilizando 0,1 M HNO₃ ó

NaOH. En un agitador rotatorio, el material fue suspendido en soluciones con diferentes concentraciones de Cr, Ni y Zn o en una solución multimetal (Cr+Ni+Zn). Las concentraciones utilizadas en las experiencias fueron de 15 mg L⁻¹ de Cr, Ni y Zn. En el caso de la solución multimetal 15 mg L⁻¹ Cr + 15 mg L⁻¹ Ni + 15 mg L⁻¹ Zn.

Las plantas fueron sometidas a los siguientes tratamientos dispuestos por duplicado:

Experimento N° 1: efectos del tiempo de contacto sobre la remoción de metales:

1) Cr	2) Ni	3) Zn	4) Cr+Ni+Zn
0 min.	0 min.	0 min.	0 min.
10 min.	10 min.	10 min.	10 min.
30 min.	30 min.	30 min.	30 min.
60 min.	60 min.	60 min.	60 min.
120 min.	120 min.	120 min.	120 min.
1440 min.	1440 min.	1440 min.	1440 min.

Experimento N° 2: efectos del tamaño de partícula sobre la remoción de metales:

1) Cr	2) Ni	3) Zn	4) Cr+Ni+Zn
1 mm	1 mm	1 mm	1 mm
2 mm	2 mm	2 mm	2 mm
3 mm	3 mm	3 mm	3 mm

Experimento N° 3: efectos de la masa de biosorbente sobre la remoción de metales:

1) Cr	2) Ni	3) Zn	4) Cr+Ni+Zn
0,05 g/100 ml	0,05 g/100 ml	0,05 g/100 ml	0,05 g/100 ml
0,1 g/100 ml	0,1 g/100 ml	0,1 g/100 ml	0,1 g/100 ml
0,5 g/100 ml	0,5 g/100 ml	0,5 g/100 ml	0,5 g/100 ml
1 g/100 ml	1 g/100 ml	1 g/100 ml	1 g/100 ml

Para el experimento N° 2 el material se tamizó con diferentes aberturas de malla de acuerdo a cada tratamiento de tamaño de partícula.

Análisis químicos:

La concentración de cada metal remanente en la solución se determinó por espectrometría de absorción atómica (Perkin Elmer, AAnalyst 300). Se determinó cualitativamente, utilizando los métodos para resinas, las propiedades de intercambio iónico

de la masa vegetal seca. Se estimó la concentración de proteínas mediante el método Kjeldhal. El área superficial de la biomasa seca se determinó utilizando el método BET con N₂ líquido, a cortos tiempos de adsorción (condiciones de equilibrio aproximadamente 2 horas). Se halló además la cantidad de grupos ácidos superficiales y totales. Para la determinación de grupos ácidos superficiales sobre las muestras de biomasa seca, previamente acondicionadas de forma tal que los grupos ácidos se encuentren en su forma sódica, se realizó la isoterma de adsorción utilizando como electrolito de adsorción cloruro de Poli-DiMetilDiAlilAmonio, titulando el exceso no adsorbido con polyvinilsulfato de potasio, utilizando como indicador azul de o-toluidina y siguiendo la absorbancia del indicador a 628 nm por circulación a través de un espectrofotómetro (ReflectaScan CE 3055). Sobre las curvas de adsorción se ajustó un modelo desarrollado para sistemas fibras – polielectrolito. Para la determinación de grupos ácidos totales, las muestras secas se humectaron durante 8 horas y se desintegraron, luego se realizaron dos sucesivos tratamientos ácidos (pH=2, 40 minutos) y luego se lavaron con agua destilada hasta conductividad en el filtrado menor a 7 µS. Luego se llevó a cabo una titulación conductimétrica, utilizando NaHCO₃ como titulante.

Análisis Estadístico:

Se realizaron análisis de la varianza de dos factores para determinar si existieron diferencias significativas entre los porcentajes de remoción de metales de agua de los distintos tratamientos aplicados.

4.4. Resultados

Las características de las hojas secas de *T. domingensis* fueron:

Área de superficie: 3,90 m² g⁻¹

Respuesta de intercambio iónico: catiónico débil

- Grupos ácidos superficiales: 0.098 meq g⁻¹,

- Grupos ácidos totales: 0.529 meq g⁻¹,

- Proteínas: 5.1%

Todos los experimentos fueron realizados a un pH inicial de 5,2 (determinado previamente como óptimo). La toma de metales en función del pH está relacionada a los grupos funcionales de la superficie (tales como grupos carboxilo e hidroxilo) y a la química del metal en solución. A bajos pH los ligandos de superficie están estrechamente asociados con los iones hidronio y en consecuencia se restringe el acercamiento de los cationes metálicos. Por otro lado, el pH no debería ser muy alto a fin de evitar la hidrólisis de metales (Sangi et al., 2008).

Considerando que la eficiencia de remoción de las hojas secas de *T. domingensis* no mejoró significativamente con el pre-tratamiento ácido o alcalino, se decidió trabajar con los tejidos secos sin tratamiento.

Para todos los metales, se observó una remoción rápida durante los primeros minutos de contacto (Fig. 4.1), alcanzando un equilibrio después de 2 hs. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la remoción de metales entre 2 y 24 hs de contacto. En el caso del Cr, no existieron diferencias significativas en la remoción entre los tratamientos de soluciones de un metal y multimetal, mientras que en el caso del Ni y Zn, el porcentaje de remoción en la solución multimetal fue significativamente mayor en comparación con el registrado en la solución de un metal.

De acuerdo a los resultados anteriores, se decidió que el tiempo de contacto de todas las experiencias fuera de 2 hs.

Al evaluar el efecto del tamaño de partícula en la eficiencia de remoción, pudo determinarse que el porcentaje de remoción de metal disminuyó significativamente con el aumento del tamaño de partícula (Fig. 4.2). Por lo tanto, el tamaño de partícula más pequeño (Malla 14: 1,18 mm) se seleccionó para el experimento siguiente realizado para estudiar el efecto de la masa de biosorbente.

La remoción de metal aumentó con el aumento de la masa de biosorbente. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre 0,5 g/100 ml y 1 g/100ml (Fig. 4.3). Por lo

La remoción de metales por hojas secas de *T. domingensis* se lleva a cabo probablemente por un proceso de adsorción, por lo tanto, el tiempo de contacto requerido para la remoción del metal es de 2 hs. El tamaño de partícula más pequeño (Malla 14: 1,18 mm) y una biomasa de 0,5 g/100 ml fueron los valores óptimos.

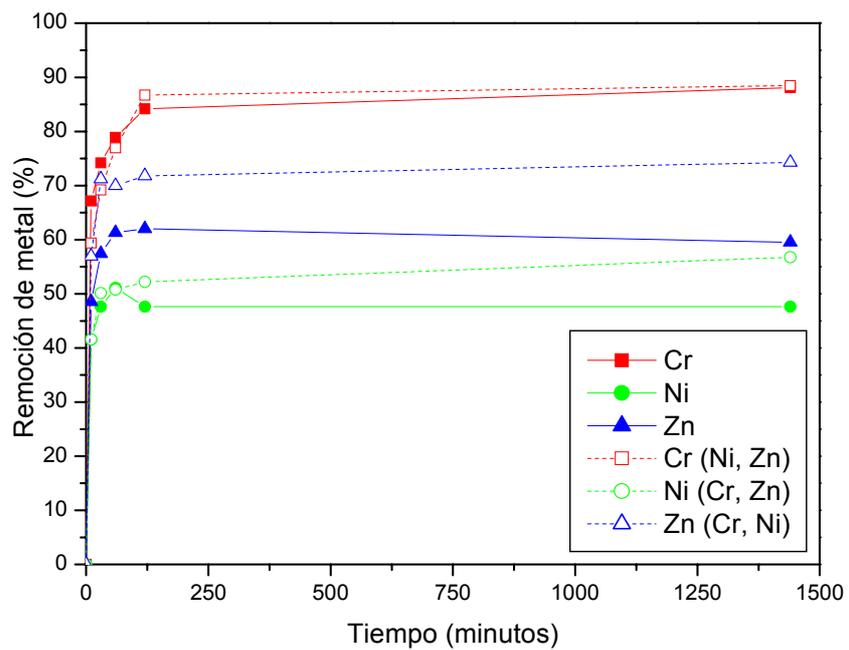


Fig. 4.1. Efectos de los diferentes tiempos de contacto sobre el porcentaje de remoción de metal en cada tratamiento.

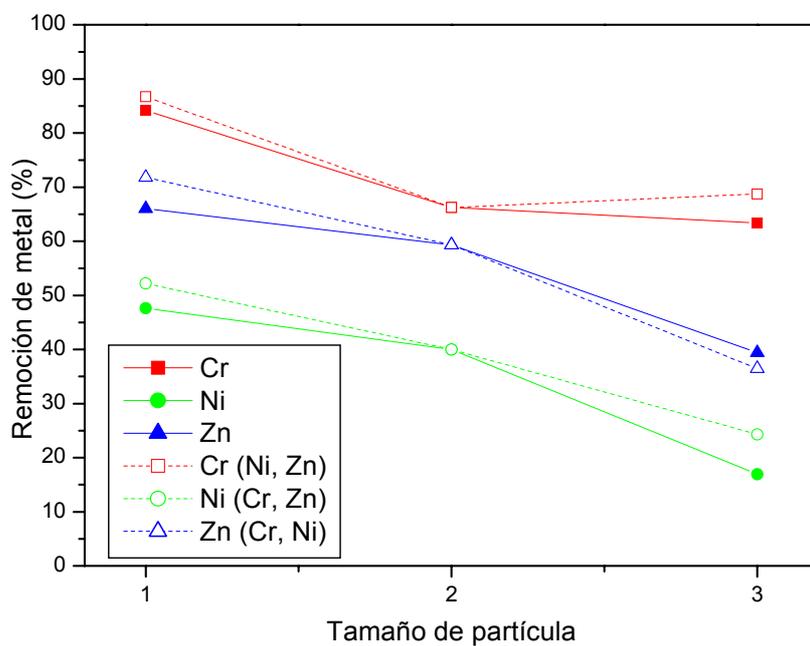


Fig. 4.2. Efectos de los diferentes tamaños de partícula sobre el porcentaje de remoción de metal en cada tratamiento.

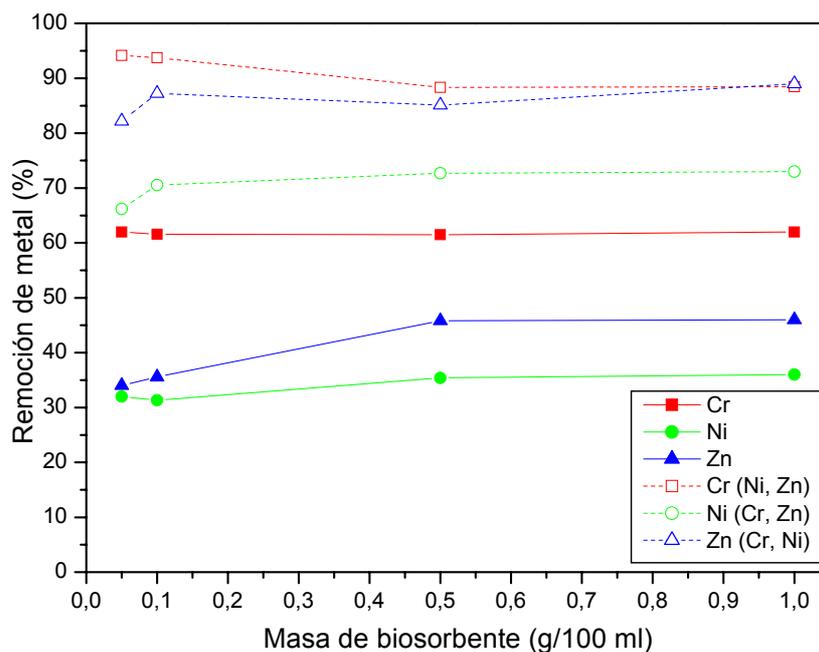


Fig. 4.3. Efectos de las diferentes masas de biosorbente sobre el porcentaje de remoción de metal en cada tratamiento.

El biosorbente estudiado fue altamente eficiente para la remoción simultánea de Cr, Ni y Zn. Los porcentajes de remoción más altos fueron alcanzados por el Cr (84,2-86,7 %), seguido por el Zn (62,0-71,7 %), y luego por el Ni (47,6- 52,2 %), tanto para las soluciones con un metal como para las soluciones multimetal. En el caso del Ni y Zn, los porcentajes de remoción en la solución multimetal fueron mayores que en las soluciones con un metal, mientras que en el caso del Cr, no se observaron diferencias significativas.

4.5. Discusión del capítulo

La sorción de Cr y Cd por raíces secas de las flotantes *Salvinia herzogii* y *Pistia stratiotes* y de hojas secas de *T. domingensis* fue estudiada por Suñé et al. (2008). Estos autores reportaron que la biomasa no viva de *P. stratiotes*, *S. herzogii* y *T. domingensis* removieron eficientemente Cr^{3+} y Cd^{2+} de la solución, siendo la biomasa de hojas de *T. domingensis* la más eficiente en la remoción de Cr^{3+} y la biomasa de raíces de *S. herzogii* la más eficiente en la remoción de Cd^{2+} . *P. stratiotes* fue la especie que presentó mayor área superficial y la mayor concentración de grupos ácidos superficiales. Una mayor área superficial está asociada a una mayor capacidad de sorción.

Se determinaron los ácidos carboxílicos libres y totales, ya que los grupos carboxílicos libres podrían probablemente proporcionar los sitios de enlace con los metales. Los grupos carboxílicos totales están relacionados al contenido de proteínas en los tejidos: a mayor cantidad de proteínas, mayor concentración de grupos carboxílicos. Las proteínas y otros tejidos biológicos, poseen átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre, que actúan como importantes átomos ligando y pueden también jugar un rol fundamental en la sorción de iones metálicos. Li et al. (1998), encontraron una relación de la adsorción de Cd^{2+} a materia orgánica con el pH utilizando espectrometría RMN de Cd-113. A pH ácidos o ligeramente ácidos el metal se acompleja a los átomos O donante de electrones, probablemente de los grupos carboxílicos, mientras que a elevados pH observaron la coordinación del metal a átomos N y no observaron evidencias de la formación de enlaces entre el metal y átomos de S en los espectros RMN. Sin embargo, Fujita (1985) trabajando con *E. crassipes* cultivada en un medio adicionado con Cd^{2+} encontró, utilizando análisis cromatográficos, que éste se presentó dentro de la planta en dos formas de elevado peso molecular que demostraron ser Cd tioneínas, es decir Cd^{2+} acomplejado al S de proteínas. Suñé et al. (2008) reportaron que *T. domingensis* presentó mayor cantidad de grupos carboxílicos totales y mayor concentración de proteínas que las especies flotantes *S. herzogii* y *P. stratiotes* y fue la que mayor número de miliequivalentes de Cr^{3+} y Cd^{2+} intercambió, sin embargo fue la especie que presentó el menor número de miliequivalentes totales intercambiados.

Abdel-Ghani et al. (2009) estudiaron la biomasa seca de hojas de *T. domingensis* como material biosorbente de Fe y Zn en función de diferentes valores de pH, temperatura y masa de biosorbente. Estos autores observaron que el pH fue el factor más importante, mientras que la temperatura fue el segundo factor en afectar la biosorción de Fe y Zn. A excepción de Suñé et al. (2008) y Abdel-Ghani et al. (2009) no se encontraron otros antecedentes de estudios de biosorción de metales que utilicen la especie *T. domingensis*. Hasta el momento, la mayoría de las investigaciones que estudiaron de la eficiencia de remoción de metales de agua utilizando diversos materiales sorbentes, tanto de origen biológico como no biológico, fueron realizadas a escala de laboratorio o “batch experiments” (Dushenkov et al., 1995; Schneider et al., 1995; Schneider y Rubio, 1999; Miretzky et al., 2006, 2010). Los resultados presentados aquí brindan un nuevo enfoque en la utilización de la biomasa seca de macrófitas. Las mismas pueden ser posicionadas como un material a emplear a escala real en sistemas de tratamiento de efluentes que integren la utilización de plantas vivas y la utilización de los productos de cosecha para así, cerrar los ciclos naturales de los materiales vegetales.

4.6. Consideraciones finales

La alta eficiencia de remoción de metales alcanzada por la utilización de la biomasa seca de hojas de *T. domingensis* en soluciones multimetales permitiría proponer que en un humedal construido para tratamiento de efluentes, cuando las hojas de *T. domingensis* sean cosechadas, podrían ser utilizadas como un material biosorbente eficiente, dándole una disposición final a estos residuos.

Los resultados obtenidos además permitieron responder el interrogante de qué ocurre con los contaminantes retenidos por las plantas cuando se tornan senescentes debido a su ciclo de crecimiento. Cuando esto ocurre las plantas mueren o se secan, como su degradación es lenta (Hammerly et al., 1989), siguen reteniendo metales dentro del humedal, que finalmente quedarán acumulados en el sedimento y no serán liberados al ambiente. Esto sería una importante ventaja para el manejo de humedales construidos. Estos detritos pueden ser removidos fácilmente del humedal para su disposición final, en caso que fuera necesario. Por otra parte, las macrófitas podrían ser cosechadas, secadas y como disposición final, utilizadas en columnas para la eliminación de metales en agua.

Pero debe tenerse en cuenta que las distintas especies de macrófitas presentan diferentes procesos y capacidades de sorción, que a su vez son diferentes para los diferentes metales, debido a sus diferentes características químicas y morfológicas. Por otra parte las condiciones o parámetros operacionales con los cuales se realiza la biosorción determinarán la eficiencia del proceso, como comprobamos experimentalmente con el tiempo de contacto, pretratamiento, tamaño de partícula, pH, etc.

El estudio de este proceso permite además dilucidar los mecanismos de remoción, al aislar los procesos biológicos de los físicos y químicos.

En la presente tesis se estudiaron los diferentes mecanismos con los que *T. domingensis* opera durante la remoción de metales y nutrientes del agua y acumulación en tejidos cuando es utilizada en un humedal construido. En la Fig 4.4 se muestra una representación de dichos mecanismos. En función de los resultados obtenidos se demostró la eficiencia de *T. domingensis* y su elevada tolerancia a los contaminantes estudiados mediante su capacidad de adaptabilidad, así como también su eficiencia para ser utilizada en un tratamiento postcosecha, lo cual convierte a los humedales construidos convencionales que utilizan *T. domingensis* en un tratamiento operativamente cíclico.

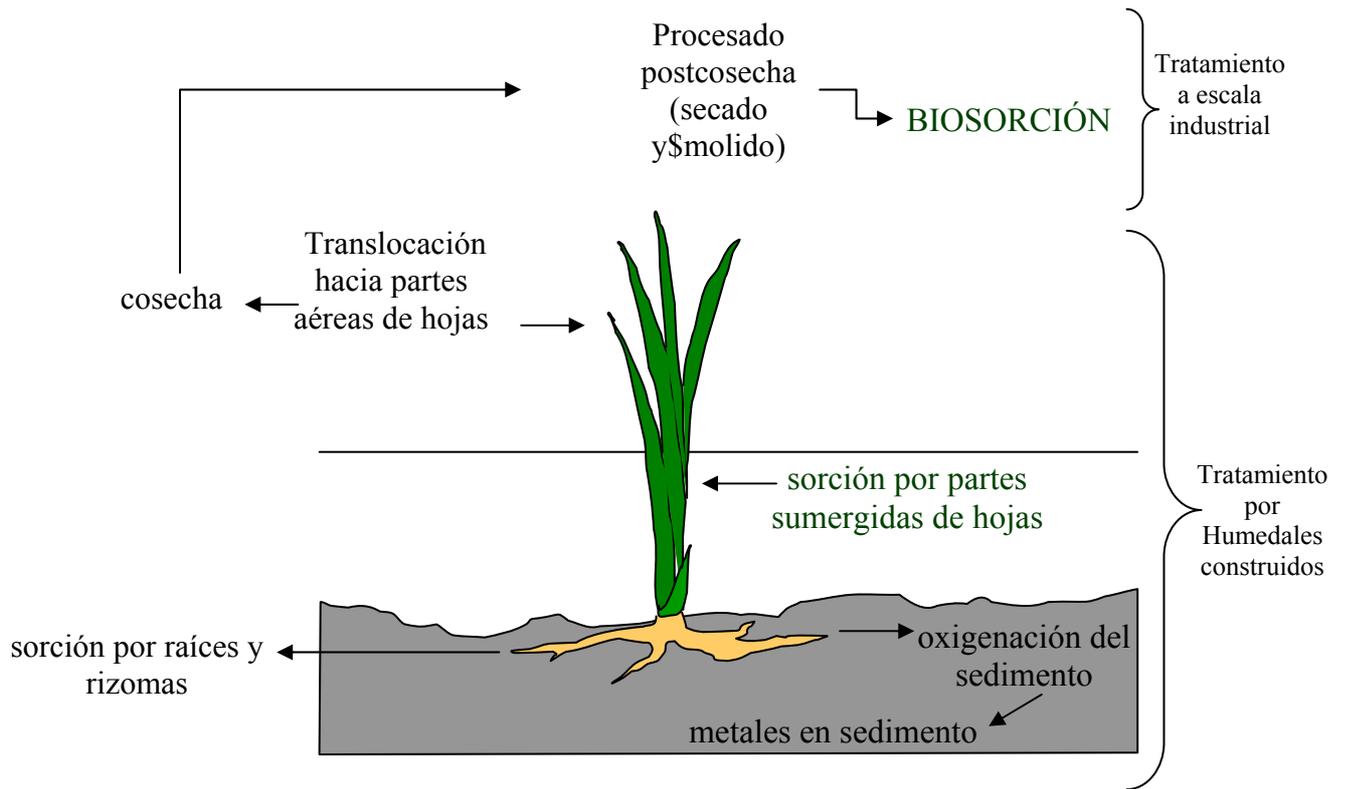


Fig. 4.4. Procesos involucrados en la fitorremediación de Cr, Ni y Zn por *T. domingensis*.

VIII. CONCLUSIONES

El humedal construido por la empresa metalúrgica resultó eficiente para la remoción de contaminantes de sus efluentes, caracterizados por la presencia de metales y elevados pH y conductividad.

Aunque la concentración de clorofila fue sensible a la toxicidad del efluente, la adaptabilidad de *T. domingensis* se vio también representada por una mayor biomasa y altura de plantas en comparación con las registradas en plantas de humedales naturales. Las adaptaciones observadas permitieron a esta especie convertirse en la dominante y mantener una alta capacidad de retención de contaminantes en el humedal construido a pesar de los disturbios que se presentaron. *T. domingensis* mostró una buena respuesta en términos de crecimiento y propagación después del evento excepcional de depredación por carpinchos.

En el humedal construido la translocación de metales hacia las partes aéreas fue restringida, por lo que la cosecha de las partes aéreas no sería un mecanismo efectivo de remoción de metales en humedales. Sin embargo, desde un punto de vista ecotoxicológico, esto podría ser una propiedad deseable ya que los metales no pasarían a las cadenas tróficas a través de los herbívoros, evitando así riesgos para el ambiente.

Las macrófitas son importantes acumuladoras de metales debido a su alta productividad y capacidad de retención en sus raíces. Sin embargo, el sedimento es un acumulador eficiente de metales, que aumenta su capacidad de retención de contaminantes si la cobertura vegetal disminuye manteniendo la capacidad de retención del sistema.

Se pudo observar que las plantas del humedal construido adquirieron con el tiempo adaptaciones fisiológicas y morfológicas para tolerar altos pH y salinidad. Contrariamente, ellas mostraron estrés cuando fueron expuestas a condiciones de pH y salinidad que son generalmente encontradas en aguas de humedales naturales. Las adaptaciones de las plantas del humedal construido fueron demostradas por la mayor tasa de crecimiento relativo y el incremento de la clorofila en comparación con los obtenidos en las plantas de un humedal natural. Por otro lado, las plantas del humedal natural mostraron estrés cuando ellas fueron expuestas a altas condiciones de pH y salinidad, normalmente encontradas en el humedal construido. A pesar de que *T. domingensis* no es una especie halófila y no posee estructuras para tolerar y excretar sales, es capaz de modificar su morfología para poder adaptarse a las condiciones extremas, como la exposición a altos valores de pH y salinidad.

En cuanto a la dinámica de acumulación y distribución de metales agregados en forma combinada ($100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr} + 100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni} + 100 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}$) se pudo observar que

las raíces responden a la toxicidad de los mismos disminuyendo sus áreas transversales y su número de vasos, aumentando estos últimos su área.

Luego de estar expuestas a metales, las hojas mostraron concentraciones de los mismos similares a las obtenidas en las raíces. Como este resultado no era coincidente con la bibliografía y con los resultados obtenidos hasta el momento por nuestro grupo de trabajo, se continuó investigando y pudo determinarse que esto sucedió cuando *T. domingensis* fue sometida a muy altas concentraciones de metales, y que la parte sumergida de las hojas fue la que presentó las mayores concentraciones debido a la sorción de metales por contacto directo con la solución, proceso similar al que se produce en raíces. Las concentraciones en la parte aérea de las hojas fue alta, siendo superiores a los valores encontrados en la bibliografía. En el caso del Ni, se observaron valores superiores en hojas que en raíces, indicando una significativa translocación. Esto podría deberse al rápido crecimiento demostrado por *T. domingensis*, debe tenerse en cuenta que a los 10 minutos de haber sido podadas las plantas para realizar los distintos experimentos, se observaba un crecimiento de 2 cm. Podría proponerse que la rápida translocación de los metales a las partes aéreas es debido a que con la poda, las plantas activan su fisiología translocando los metales a estos órganos. Como las concentraciones estudiadas son extremadamente mayores que las que se encuentran habitualmente tanto en humedales naturales como contruidos para tratamiento de efluentes, los resultados obtenidos demostrarían la capacidad de *T. domingensis* para sobrevivir ante un accidental volcado de altas concentraciones de estos metales a un sistema acuático.

En los tratamientos con concentraciones de 500 mg L⁻¹ de metales separados y de metales combinados se observó una menor remoción en agua. *T. domingensis* toleró esas concentraciones de metales debido a que dejó de absorberlos, posiblemente para evitar que estas concentraciones causen daños irreversibles en órganos vitales. Por otra parte, las partes sumergidas de las hojas fueron un compartimiento muy eficiente para la acumulación de metales y P debido a que estos tejidos se encuentran en contacto directo con la solución experimental. Sin embargo, fue el sedimento el compartimiento que presentó la mayor acumulación de metales y de P. Las plantas no toleraron la exposición a 100 mg L⁻¹ Ni y 500 mg L⁻¹ Ni y la combinación de 500 mg L⁻¹ Cr + 500 mg L⁻¹ Ni + 500 mg L⁻¹ Zn.

A la luz de estos resultados, en un siguiente experimento se expuso a *T. domingensis* a concentraciones aún mayores de metales pero agregando nutrientes (P y N) para poder evaluar su tolerancia en base a la tasa de crecimiento y a la concentración de clorofila. Se concluye que las plantas no toleraron la exposición a 600 mg L⁻¹ Ni y se observó inhibición

en el crecimiento frente a la combinación de $600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr} + 600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni} + 600 \text{ mg L}^{-1} \text{ Zn}$. Sin embargo, el agregado de nutrientes favoreció la tolerancia de las plantas, representada por el aumento en la tasa de crecimiento y la concentración de clorofila.

La alta eficiencia de remoción de metales alcanzada por la utilización de la biomasa seca de hojas de *T. domingensis* en soluciones multimetales permitiría proponer que en un humedal construido para tratamiento de efluentes, cuando las hojas de *T. domingensis* sean cosechadas, podrían ser utilizadas como un material biosorbente eficiente, dándole una disposición final a estos residuos. Por otra parte, las condiciones o parámetros operacionales con los cuales se realiza la biosorción determinarán la eficiencia del proceso, como comprobamos experimentalmente a diferentes pretratamientos, tiempos de contacto, tamaños de partícula y masa de biosorbente. Los resultados obtenidos además permitieron responder el interrogante de qué ocurre con los contaminantes retenidos por las plantas cuando se tornan senescentes debido a su ciclo de crecimiento. Cuando esto ocurre las plantas mueren o se secan, como su degradación es lenta, siguen reteniendo metales dentro del humedal, los cuales finalmente quedarán acumulados en el sedimento y no serán liberados al ambiente. Esto sería una importante ventaja para el manejo de humedales construidos. Estos detritos pueden ser removidos fácilmente del humedal para su disposición final, en caso que fuera necesario.

IX. BIBLIOGRFÍA

- Abbasi, S.A. 1987. Aquatic plant based water treatment systems in Asia. En: Aquatic plants for water treatment and resource recovery (Reddy, K. R y Smith, W. H. Eds.), p. 175-180.
- Abdel-Ghani, N.T., Hegazy, A.K., El-Chaghaby, G.A. y Lima, E.C. 2009. Factorial experimental design for biosorption of iron and zinc using *Typha domingensis* phytomass. *Desalination*. 249: 343-347.
- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentaste, E., Sarzanini, C. y Barberis, R. 2002. Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. *Environ Poll*, 119: 177.
- Adler, P.R., Summerfelt, S.T., Glenn, D.M. y Takeda, F. 1996. Evaluation of a wetland system designed to meet stringent phosphorus discharge requirements. *Water Environ. Res.* 68(5): 836-840.
- Amarante, L., Lima, J.D. y Sodek, L. 2006. Grow and stress conditions cause similar changes in xilem amino acids for different legume species. *J Exp Bot* 58: 123-9.
- Ansola, G.; González, J.M.; Cortijo, R. y de Luis, E. 2003. Experimental and full-scale pilot plant constructed wetlands for municipal wastewaters treatment. *Ecol. Eng.* 21: 43-52.
- APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Amer. Publ. Health Assoc., N.Y., 1268.
- Arduini, I., Masoni, A. y Ercoli, L. 2006. Effects of highchromium applications on miscanthus during the period of maximum growth. *Environ. Exp. Bot.* 58: 234-243.
- Armstrong, W. 1978. Root aeration in the wetland condition. En: D.D. Hook, R.M.M. Crawford (Eds.), *Plant Life in Anaerobic Environments. Processes in Anaerobiosis* (pp. 269-298). Michigan: Ann Arbor Science.
- Athie, D. y Cerri, C.C. 1987. The use of macrophytes in water pollution control. Pergamon Press, Oxford, U. K. 186 p.
- Banerjee, G. y Sarker, S. 1997. The role of *Salvinia rotundifolia* in scavenging aquatic Pb(II) pollution: a case study. *Bioprocess Eng.* 17: 295-300.
- Baran, E.J. 1995. *Química Bioinorgánica*. McGraw-Hill/Interamericana de España. Madrid. 321 p.
- Barko, J.W., Gunnison, D. y Carpenter, S.R. 1991. Sediment interactions with submersed macrophyte growth and community dynamics. *Aquat. Bot.* 41: 41-65.
- Barnabas, A.D. 1988. Apoplastic tracer studies in the leaves of a seagrass. I. Pathway through epidermal and mesophyll tissues. *Aquat. Bot.* 32: 63-77.

- Beining, B. y Otte, M. 1997. Retention of metals and longevity of a wetland receiving mine leachate. En: Proceedings 14th Annual National Meeting: An Environmental Commitment (Brandt, J.E.; Galevotic, J.R.; Kost, L. y Trouart, J. eds.). American Society for Surface Mining and Reclamation, Austin, Mayo 10-15.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17:21-34.
- Bernard, J.M. 1999. Seasonal growth patterns in wetland plants growing in landfill leachate. En: Constructed Wetlands for the Treatment of Landfill Leachates (Mulamootil, G.; McBean, E. A. y Rovers, F. Eds.). Lewis Publishers. 223-233 p.
- Bishop, P. y Eighmy, T. 1989. Aquatic wastewater treatment using *Elodea nutallii*. *J. Water Pollut. Con. F.* 61(5): 641-648.
- Bonet, A., Poschenrieder, Ch., Barceló, J. 1991. ChromiumIII-Iron interactions in Fe-deficient and Fe-sufficient bean plants. I. Growth and nutrient content. *J Plant Nut* 14: 403-414.
- Bonilla, I. 2008. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal (Azcón-Bieto, J, Talón, M. eds.). Mc Graw Hill-UBe. 103-121 pp.
- Borkert, C.M., Cox, F.R., Tucker, M.R. 1998. Zinc and copper toxicity in peanut, soybean, rice and corn in soil mixtures. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 29: 2991-3005.
- Brady D., Letebele B., Duncan, J.R. y Rose, P.D. 1994. Bioaccumulation of metals by *Scenedesmus*, *Selenastrum* and *Chlorella* algae. *Water S.A.* 20: 213-218.
- Brewster, M.D. y Passmore, R.J. 1994. Use of Electrochemical Ion Generation for Removing Heavy Metals from Contaminated Groundwater, *Environmental Progress*, 13(2): 143-148.
- Burton, K.W., King, J.B. y Morgan, E. 2004. Chlorophyll as an indicator of the upper critical tissue concentration of cadmium in plants. *Water Air Soil Poll.* 27: 147-154.
- Calheiros, C.S.C., Rangel, A.O.S.S., Castro, P.M.L. 2007. Constructed wetland systems vegetated with different plants applied to the treatment of tannery wastewater. *Water Res.* 41(8): 1790-1798.
- Callahan, M.A., Slimak, M.W. y Gabel, N.W. 1979. Water-Related Environmental Fate of 129 Priority Pollutants, Vol. 1. Washington, D.C. USEPA, EPA-440/4-79-029a.
- Campanella, M.V., Hadad, H., Maine, M.A. y Markariani, R. 2005. Efectos del fósforo de un efluente cloacal sobre la morfología interna y externa de *Eichhornia crassipes* (Mart. Solms) en un humedal artificial. *Limnetica.* 24(3-4): 263-272.

- Cardwell, A.J., Hawker, D.W. y Greenway, M. 2002. Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia. *Chemosphere*. 48: 653-663.
- Carranza- Alvarez, C., Alonso-Castro, A.J., Alfaro-De La Torre, M.C. y García De La Cruz, R.F. 2008. Accumulation and distribution of heavy metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an artificial lagoon in San Luis Potosí, México. *Water Air Soil Pollut.* 188: 297-309.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). 1996. A Framework for Ecological Risk Assessment: General Guidance-PN1195.
- Chandra, R., Yadav, S. 2010. Potential of *Typha angustifolia* for phytoremediation of heavy metals from aqueous solution of phenol and melanoidin. *Ecol. Eng.* 36: 1277-1284.
- Chaney, R. 1993. Zinc phytotoxicity. En: *Zinc in soils and plants.* (ed. Robson, A.). Kluwer, Dordercht. 135-150 p.
- Ciro, A., Joao, P.T.W., Silvelena, V. y Valdir, J.R. 1999. The significance of root growth on cotton nutrition in an acidic low-P soil. *Plant. Soil.* 212: 185 – 190.
- Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88:1707-1719.
- Cobbett, C., y Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 53: 159-182.
- Cole, S. 1998. The emergence of treatment wetlands. *Environ Sci y Technol.* 32: 218A-223A.
- Coleman, R.N. y Paran, J.H. 1991. Biofilm concentration of chromium. *Environmental Technology.* 12: 1079-1093.
- D' Ambrogio de Argüeso, A. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. I-IV. Hemisfero Sur S. A., Buenos Aires. 83 p.
- D'Angelo, E. y Reddy, K. 1993. Ammonium oxidation and nitrate reduction in sediment of a hypereutrophic lake. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57(4): 1156-1163.
- De Luis Calabuig, E. 2001. Experiencias de Tratamiento de Efluentes con macrófitas en España. Conferencia del Curso Internacional Tecnologías de Bajo Costo para el Tratamiento de efluentes Agroindustriales. LATU (Laboratorio Tecnológico del Uruguay). Montevideo, Uruguay, 2001.
- de Wet, L.P.D., Schoonbee, H.J., Pretorius, J. y Bezuidenhout, L.M. 1990. Bioaccumulation of selected heavy metals by the water fern, *Azolla filiculoides* Lam. in a wetland ecosystem affected by sewage, mine and industrial pollution. *Water SA.* 16: 281-286.

- Deer, W.A., Howie, R.A. y Zussman, J. 1996. An introduction to the rock-forming minerals. Prentice Hall, USA. 712 p.
- Delgado, M., Bigeriego M. y Guardiola, E. 1993. Uptake of Zn, Cr and Cr by water Hyacinths. *Wat. Res.* 27 (2): 269-270.
- Deng, H., Yea, Z.H. y Wong, M.H. 2004. Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. *Environ. Poll.* 132: 29-40.
- Desnos, T. 2008. Root branching responses to phosphate and nitrate. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 82-87.
- Di Luca, G.A., Maine, M.A., Mufarrege, M.M., Hadad, H.R., Sánchez, G.C., Bonetto, C.A. 2011. Metal fractionation in the sediment of a constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Ecological Engineering.* 37: 1267-1275.
- Dimitri, M. J. 1977. Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. Descripción de las plantas cultivadas. Tomo I. Primer volumen. Ed. ACME, 3 era. ed. Bs. As. 1161 p.
- Dordio, A.V., Belo, M., Martins Teixeira, D., Palace Carvalho, A.J., Dias, C.M.B., Picó, Y. y Pinto, A.P. 2011. Evaluation of carbamazepine uptake and metabolization by *Typha* spp., a plant with potential use in phytotreatment. *Biores. Technol.* 112: 7827-7834.
- Dushenkov, V. P., Nanda Kumar, B. A., Motto, H. y Raskin, Y. 1995. Rhizofiltration: The use of Plants to remove Heavy Metals from Aqueous Streams. *Environ. Sci. Technol.* 29: 1239-1245.
- Dyhr-Jensen, K. y Brix, H. 1996. Effects of pH on ammonium uptake by *Typha latifolia* L. *Plant Cell and Environment* 19: 1431-1436.
- Elifantz, H., Tel-Or, E. 2002. Heavy metal biosorption by plant biomass of the macrophyte *Ludwigia stolonifera*. *Water Air Soil Pollut.* 141: 207-218.
- Ellis, J., Shutes, R., Revitt, D., Zhang, T. 1994. Use of macrophytes for pollution treatment in urban wetlands. *Conserv. Recycl.* 11: 1-12.
- Fakayode, S.O. y Onianwa, P.C. 2002. Heavy metal contamination of soil, and bioaccumulation in Guinea grass (*Panicum maximum*) around Ikeja Industrial Estate, Lagos, Nigeria. *Environ. Geol.* 43: 145-150.
- Fediuc, E., Lips, S.H. y Erdei, L. 2005. O-Acetylserine (thiol) lyase activity in *Phragmites* and *Typha* plants under cadmium and NaCl stress conditions and the involvement of ABA in the stress response. *J. Plant Physiol.* 162: 865-872.

- Fraústo Da Silva, J.J.R., Williams R.J.P. 1993. *The Biological Chemistry of the Elements. The inorganic chemistry of life.* Clarendon Press. Oxford.
- Fritiof, A. y Greger, M. 2006. Uptake and distribution of Zn, Cu, Cd, and Pb in an aquatic plant *Potamogeton natans*. *Chemosphere*. 63: 220-227.
- Fujita, M. 1985. The Presence of Two Cd-Binding Components in the Roots of Water Hyacinth Cultivated in a Cd²⁺-Containing Medium. *Plant Cell Physiol*. 26: 295-300.
- Galil, N., y Rebhun, M. 1990. A Comparative Study of RBC and Activated Sludge in Biotreatment of Wastewater from an Integrated Oil Refinery. 44th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings, 1990, Chelsea, Michigan. 711-717.
- Gasic, K. y Korban, S. 2006. Heavy metal stress. En: Madhava Rao, K.V., Raghavendra, A.S., Janardhan Reddy. K (Eds.) *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants.* Springer. 219-254 pp.
- Gaudet, C.L. y Keddy, P.A. 1995. Competitive performance and species distribution in shoreline plant communities: a comparative approach. *Ecology*. 76(1): 280-291.
- Geckeler, K.E. y Volchek, K. 1996. Removal of hazardous substances from water using ultrafiltration in conjunction with soluble polymers. *Environ. Sci. Technol.* 30(3): 725-734.
- Gersberg, R. M., Elkins, B.V., Lyon S.R y Goldman, C.R. 1986. Role of aquatic plants in wastewater treatment by artificial wetlands. *Wat. Res.* 20: 363-368.
- Gibson, J.P. y Pollard, A.J. 1988. Zinc tolerance in *Panicum virgatum* L. (Switchgrass) from the Picher Mine area. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*. 68: 45-49.
- Glenn, E., Thompson, L.T., Frye, R., Riley, J. y Baumgartner, D. 1995. Effects of salinity on growth and evapotranspiration of *Typha domingensis* Pers. *Aquat. Bot.* 52: 75-91.
- Golterman, H., Bonetto, C. y Minzoni, F. 1988. The nitrogen cycle in shallow water sediment systems of rice fields. Part III: The influence of N-application on the yield of rice. *Hydrobiologia*. 159: 211-217.
- Gómez Cerezo, R.; Suárez, M.L. y Vidal-Abarca, M.R. 2001. The performance of a multi-stage system of constructed wetlands for urban wastewater treatment in a semiarid region of SE Spain. *Ecol. Eng.* 16: 501-517.
- Göthberg, A., Greger, M., Holm, K. y Bengtsson, B.E. 2004. Influence of nutrient levels on uptake and effects of mercury, cadmium and lead in water spinach. *J. Environ. Qual.* 33: 1247-1255.
- Ground Water. EPA/600/6-85/002 a. U.S. Environmental Protection Agency.

- Hadad, H.R., Maine, M.A., Bonetto, C. 2006. Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere*. 63(10): 1744-1753.
- 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*. *J. Haz. Mat.*190: 1016-1022.
- Hadad, H.R., Maine, M.A., Natale, G.S. y Bonetto, C. 2007. The effect of nutrient addition on metal tolerance in *Salvinia herzogii*. *Ecol. Eng.* 31(2): 122-131.
- Hadad, H.R., Maine, M.A., Pincirolí, M. y Mufarrije, M.M. 2009. Nickel and phosphorous sorption efficiencies, tissue accumulation kinetics and morphological effects on *Eichhornia crassipes*. *Ecotoxicology*. 18(5): 504-513.
- Hadad, H.R., Mufarrije, M.M., Pincirolí, M., Di Luca, G.A., Maine, M.A. 2010. Morphological response of *Typha domingensis* to an industrial effluent containing heavy metals in a constructed wetland. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58(3): 666-675.
- Hamer, D. 1986. Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* 55:913-951.
- Hammer, D.A. y Bastion, R.K. 1989. Wetlands ecosystems : Natural water purifiers? Pp.5-20. En: *Constructed wetlands for wastewater treatment*. Hammer, D.A. ed. Lewis publishers, Chelsea, Michigan.
- Hammerly, J., Leguizamón, M., Maine, M.A., Schiver, D., Pizarro, M.J. 1989. Decomposition rate of plant material in the Parana Medio River (Argentina). 183(3): 179-184.
- Hegazy, A.K., Abdel Ghani, N.T. y El-Chaghaby, G.A. 2011. Phytoremediation of industrial wastewater potentiality by *Typha domingensis*. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 8 (3), 639-648
- Hunt, R., 1978. *Studies in Biology* N° 96. Edward Arnold Ltd.Lond.: 12-16.
- Jenssen, P.D., Mahlum, T. y Krogstad, T. 1993. Potential use of constructed wetlands for wastewater treatment in northern environments. *Wat. Sci. Technol.* 28: 149-157.
- Kabata-Pendias, A. y Pendias, H. 2000. *Trace Elements in Soils and Plants*. Florida: CRC Press.
- Kadlec, R.H. y Wallace, S.D. 2009. *Treatment Wetlands*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kadlec, R.H., Knight, R.L., Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P. y Haberl, R. 2000. *Constructed Wetlands for Pollution Control: Processes, Performance, Design and Operation*. IWA

- Specialist Group on Use of Macrophytes in Water Pollution Control. IWA Publishing.
- Kaim, W. y Schwederski, B. 1994. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry Life*. John Wiley & Sons, New York.
- Kapitonova, O.A. 2002. Specific anatomical features of vegetative organs in some macrophyte species under conditions of industrial pollution. *Russ. J. Ecol.* 33(1): 59-61.
- Karathanasis, A.D., Potter, C.L. y Coyne, M.S. 2003. Vegetation Effects on Fecal Bacteria, BOD, and TSS Removal in Constructed Wetlands Treating Domestic Wastewater. *J. Ecol. Eng.* 20: 157-169.
- Keddy, P.A., Twolan-Strutt, L. y Wisheu, I.C. 1994. Competitive effect and response rankings in 20 wetland plants: are they consistent across three environments? *J. Ecol.* 82: 635-643.
- Keller, B.E.M., Lajtha, K. y Cristofor, S. 1998. Trace metal concentrations in the sediments and plants of the Danube Delta, Romania. *Wetlands.* 18: 42-50.
- Kolotov, B.A., Demidov, V.V. y Volkov, S.N. 2004. Chlorophyll content as a primary indicator of the environment degradation due to contamination with heavy metals. *Doklady Biol. Sci.* 393: 550-552.
- Lallana, V.H. y Kieffer, L.A. 1988. Efecto del enriquecimiento de nutrientes en el crecimiento de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms – Laubach “Camalote”. *Rev. Asoc. Cs. Nat. Lit.* 19(2): 183-199.
- Li, J., Perdue, E.M. y Gelbaum, L.T. 1998. Using cadmium-113 NMR spectrometry to study metal complexation by natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 32:44, 483-487.
- Loneragan, J. y Weeb, M. 1993. Interactions between Zinc and other nutrients affecting the growth of plants. En: *Zinc in Soils and Plants* (Robson, A. ed.). Kluwer, Dordercht. 119-131 p.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella, L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 6: 280-287.
- Losi, M.E., C. Amrhein, y Frankenberger, W.T. 1994. Environmental biochemistry of Chromium, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 136: 91-131.

- Lytle, C.M., Lytle, F.W., Yang, N., Quian, J.H., Hansen, D., Zayed, A. y Terry, N. 1998. Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by wetland plants: Potential for in situ heavy metal detoxification. *Environm. Sci. Technol.* 32: 3087-3093.
- Macek, P. y Rejmánková, E. 2007. Response of emergent macrophytes to experimental nutrient and salinity additions. *Funct. Ecol.* 21: 478-488.
- Maddison, M., Muring, T., Remm, k., Lesta, M. y Mander, U. 2009. Dynamics of *Typha latifolia* L. populations in treatment wetlands in Estonia. *Ecol. Eng.* 35: 258-264.
- Mahler, R.L. 2003. General overview of nutrition for field and container crops. In: Riley, L. E.; Dumroese, R. K.; Landis, T. D. Tech Coords. National Proceeding: Forest and Conservation Nursery Associations. 2003 June 9-12; Coeur d'Alene, ID; and 2003 July 14-17; Springfield, IL. Proc. RMRS-P-33.
- Maine, M. A.; Duarte, M y Suñe, N. 2001. Cadmium uptake by floating macrophytes. *Water Res.* 35: 2629-2634.
- Maine, M. A., Suñe, N., Hadad, H., Sánchez, G. y Bonetto, C. 2006. Nutrient and metal removal in a constructed wetland for waste-water treatment from a metallurgic industry. *Ecol. Eng.* 26: 341-347.
- Maine, M.A., Panigatti, M.C. y Pizarro, M.J.1998. Role of macrophytes in phosphorus removal in Parana medio wetlands. *Pols. Archiw. Hydrobiol.* 45(1): 23-34.
- Maine, M.A., Suñe, N., Hadad, H., Sánchez, G. y Bonetto, C. 2007. Removal efficiency of a constructed wetland for wastewater treatment according to vegetation dominance. *Chemosphere.* 68:1105–1113.
- Maine, M.A., Suñe, N., Hadad, R.H., Sánchez, G.C., Bonetto, C. 2009. Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland. *J Environ Manag.* 90: 355-363.
- Maine, M.A., Suñe, N.L. y Lager, S.C. 2004. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Res.* 38: 1494-1501.
- Maine, M.A.; Suñe, N.; Hadad, H.; Sánchez, G. y Bonetto, C. 2005. Phosphate and metal retention in a small-scale constructed wetland for waste-water treatment. En: *Phosphates in Sediments. Proceedings of the 4th International Symposium* (Golterman, H. L. y Serrano, L. eds.). Backhuys Publishers. Leiden. 21-31 p.
- Maine, M.A.; Suñe, N.L. y S.C. Lager 2004. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Res.* 38: 1494-1501.

- Manios, T., Stentiford, E. y Millner, P. 2003. The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. *Ecol. Eng.* 20: 65-74.
- Mariñelarena, A., Di Giorgi, H. y Donadelli, J. 2005. Humedales construidos para el tratamiento avanzado de efluentes industriales. Libro de resúmenes del “III Congreso Argentino de Limnología”. INTECH (Instituto Tecnológico de Chascomús), IIB (Instituto de Investigaciones Biotecnológicas) - CONICET. Chascomús, 31 de octubre-2 de noviembre. p. 46.
- Markus, J. y Kertes, A.S. 1969. Ion exchange and solvent extraction of metal complexes. Wiley. New York.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E. y Marmioli, N. 2005. Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis. *Environ. Pollut.* 134: 217-227.
- Martin, M.H. y Coughtrey, P.J. 1982. Biological monitoring of heavy metal pollution. Applied Science Publishers, London.
- Matheson, F., Nguyen, M., Cooper, A., Burt, T. y Bull, E. 2002. Fate of ¹⁵N-nitrate in unplanted, planted and harvested riparian wetland soil microcosms. *Ecol. Eng.* 19: 249-264.
- McGrath, S.P. y Smith, S. 1990. Chromium and nickel. En: *Heavy Metals in Soils* (Alloway; B.J., Ed), pp 125-150. Wiley, New York.
- Memon, A.R., Aktoprakligür, D., Zdemür, A. y Vertii, A. 2001. Heavy Metal Accumulation and Detoxification Mechanisms in Plants. *Turk J Bot.* 25: 111-121.
- Merlin, G., Pajean, J.L. y Lissolo, T. 2002. Performances of constructed wetlands for municipal wastewater treatment in rural mountainous area. *Hydrobiologia.* 469(1): 87-98.
- Mills, W.B., Porcella, D.B., Unger, M.J., Gherini, S.A., Summers, K.V., Mok, L., Rupp, G.L., Bowie, G.L. y Haith, D.L. September 1985. *Water Quality Assessment: A Screening Procedure for Toxic and Conventional Pollutants in Surface and ground water Part 1.* EPA 600/6-85-002a. U. S. Environmental Protection Agency. Athens, Georgia.
- Minzoni, F., Bonetto, C. y Golterman, H. 1988. The nitrogen cycle in shallow water sediment systems of rice fields. Part I: The denitrification process. *Hydrobiologia.* 159: 189-202.

- Miretzky, P., Muñoz, C., Carrillo-Chavez, A. 2010. Cd (II) removal from aqueous solution by *Eleocharis acicularis* biomass, equilibrium and kinetic studies. *Biores. Technol.* 101: 2637–2642.
- Miretzky, P., Saralegui, A. y Fernández Cirelli, A. 2006. Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes. *Chemosphere.* 66(2): 247-254.
- Monni, S., Salemaa, M. y Millar, N. 2000. The tolerance of *Empetrum nigrum* to copper and nickel. *Environ. Poll.* 109: 221-229.
- Mufarrege, M.M. Hadad, H.R. y Maine, M.A. 2010. Response of *Pistia stratiotes* to heavy metals (Cr, Ni, and Zn) and phosphorous. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 58(1): 53-61.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25: 239-250.
- Munns, R., Greenway, H. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 149-90.
- Munns, R., Greenway, H., Kirst, G.O. 1993. Halotolerant eukaryotes. En: Lange, O.L., Nobel, P.S., Osmond, C.B., Ziegler, H.H. (Eds.) *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series, Vol. 12C)*. Springer Verlag, Berlin, pp. 59-135.
- Murphy, J., Riley, J. 1962. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta.* 27: 31-36.
- Neiff, J.J., Poi de Neiff, A., Casco, S.L. 2001. The effect of extreme floods on *Eichhornia crassipes* (Mart. Solms) growth in Paraná River floodplain lakes. *Acta Limnol. Bras.* 13(1): 51-60.
- Newman, M.C. 1998. *Fundamentals of ecotoxicology*. Sleeping Bear/Ann Arbor Press. Chelsea. 402 p.
- Nilratnisakorn, S., Thiravetyan, P., Nakbanpote, W. 2007. Synthetic reactive dye wastewater treatment by narrow-leaved cattails (*Typha angustifolia* Linn.): Effects of dye, salinity and metals. *Sci. Tot. Environ.* 384: 67-76.
- Ohtake, H., Fujii, E. y Toda, K. 1990. Reduction of toxic chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *Environ. Tech.* 11: 663-668.
- Panigatti, M.C. y Maine, M.A. 2003. Influence of nitrogen species (NH_4^+ and NO_3^-) on the dynamics of P in water-sediment–*Salvinia herzogii* systems. *Hydrobiologia.* 492: 151-157.
- Parida, A.K. y Das, A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60: 324-49.

- Perdomo, S., Bangueses, C., Fuentes, J., Castro, J., Acevedo, H y Michelotti, C. 2000. Constructed wetlands: A more suitable alternative for wastewater purification in uruguayan dairy processing industry. Proceedings 7th International Conference on Wetland Systems for Water Pollution Control. International Association on Water Quality (IAWQ). 1407-1415. Florida.
- Pérez, C. 1998. Métodos estadísticos con Statgraphics. RA-MA. Madrid. 705 p.
- Peterson, S. y Teal, J. 1996. The role of plants in ecologically engineered wastewater treatment systems. *Ecol. Eng.* 6: 137-148.
- Pollard, A.J. y Baker, A.J.M. 1997. Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytol.* 135: 655-658.
- Pomponi, N., Censi, V., Di Girolamo, U., De Paolis, A., Di Toppi, L.S., Aromolo, R., Constantino, P., Cardarelli, M. 2006. Over expression of Arabidopsis phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta* 223:180-190.
- Pontier, H., Williams, J.B. y May, E. 2004. Progressive changes in water and sediment quality in a wetland system for control of highway runoff. *Sci. Tot. Environ.* 319: 215-224.
- Popp, M. 1995. Salt resistance in herbaceous halophytes and mangroves. *Prog. Bot.* 56: 415-429.
- Poschenrieder, C., Tolrà, R. y Barceló, J. 2006. Can metal defend plants against biotic stress? *Trends Plant Sci.* 11(6): 288-295.
- Prakash, O., Mehroira, I. y Kumar, P. 1987. Removal of Cadmium from water by water hyacinth. *J. Environ. Eng.* 113: 352-365.
- Rana, S.V.S. 2008. Metals and apoptosis: recent developments. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 22: 262-284.
- Reddy, K. R. y Sutton, D. L. 1984. Water hyacinths for water quality improvement and biomass production. *J. Environ. Qual.* 13: 1-7.
- Reddy, K.; Patrick, W. y Lindau, C. 1989. Nitrification-denitrification at the plant root-sediment interface in wetlands. *Limnol. Oceanogr.* 34(6): 1004-1013.
- Reddy, S. 1983. Agroclimatic clasification of semi arid tropics. II Identification of clasificatory variables - *Agric. Meteorol.* 30: 201-219.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I. 1995. Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiology* 109:1427-1433.

- Salt, D.E., Pickering, I.J., Prince, R.C., Gleba, D., Dushenkov, S., Smith, R.D. y Raskin, I. 1997. Metal Accumulation by Aquacultured Seedlings of Indian Mustard. *Environmental Science and Technology*. 31(6): 1636 - 1644.
- Sangi, M.; Shahmoradi, A.; Zolgharnein, J.; Azimi, G. y Ghorbandoost, M. (2008). Removal and recovery of heavy metals from aqueous solution using *Ulmus carpinifolia* and *Fraxinus excelsior* tree leaves. *J. Haz. Mat.* 155 (3-15): 513-522.
- Satyakala, G., Kaiser, J. 1997. Chromium induced biochemical changes in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. and *Pistia stratiotes* L. *B. Environ Contam Tox* 10: 159-169.
- Saunders, D. L. y Kalff, J. 2001. Nitrogen retention in wetlands, lakes and rivers. *Hydrobiologia*. 443(1): 205-212.
- Schneider, I., Rubio, J. 1999. Sorption of heavy metal ions by the nonliving biomass of freshwater macrophytes. *Environ. Sci. Technol.* 33: 2213-2217.
- Schneider, I.A.H., Rubio, J., Misra, M., Smith, R.W. 1995. Stems and roots of *Eichhornia crassipes* as biosorbents for heavy metal ions. *Miner. Eng.* 8, 979-988.
- Schoeder, H.A., 1973. *Trace Elements and Man*, Devin-Aldair, Old Greenwich, Conn. p. 171.
- Sedlack, R. I. 1991. Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater. 2nd ed. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan. 256 p.
- Sen, A.K. y Bhattacharyya, M. 1994. Studies of uptake and toxic effects of Ni(II) on *Salvinia natans*. *Water Air Soil Poll.* 78: 141-152.
- Sinha, S. y Gupta, A. K. 2005. Translocation of metals from fly ash amended soil in the plant of *Sesbania cannabina* L. Ritz: effect on antioxidants. *Chemosphere*. 61: 1204-1214.
- Sivori, E.M., Montaldi, E.R. y Casco, O.H. 1980. *Fisiología vegetal*. Ed. Hemisferio Sur. 681 pp.
- Soltan, M.E. y Rashed, M.N. 2003. Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metals concentrations. *Adv. Environ. Res.* 7: 321-334.
- Song, Z., Zheng, Z., Li, J.; Sun, X., Han, X., Wang, W. y M. Xu. 2006. Seasonal and annual performance of a full-scale constructed wetland system for sewage treatment in China. *Ecol. Eng.* 26: 272-282.
- Sorrell, B.K. y Boon, P.L. 1992. Biogeochemistry of billabong sediments II. Seasonal variations in methane production. *Freshwater Biol.* 27: 435-445.

- Sousa, A.I., Caçador, I., Lillebo, A.I. y Pardal, M.A. 2008. Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: Intra- and extra-cellular metal binding sites. *Chemosphere*. 70: 850-857.
- Stoltz, E. y Greger, M. 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environ. Exp. Bot.* 47: 271-280.
- Suñé, N., Sánchez, G., Caffaratti, S. y Maine, M.A. 2007. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environ. Poll.* 145(2): 467-473.
- Suñé, N., Sánchez, G., Pedro, M.C., Caffaratti, S. y Maine, M.A. 2008. Sorción de Cr y Cd por biomasa seca de tres plantas acuáticas. Libro de resúmenes del V Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental. Sociedad Iberoamericana de Física y Química Ambiental. Mar del Plata, 14-18 de abril. 139-144 p.
- Taylor, G.J. y Crowder, A.A. 1983. Uptake and accumulation of copper, nickel, and iron by *Typha latifolia* grown in solution culture. *Can. J. Bot.*, 61, 1825-1830.
- Tchobanoglous, G. y F.L. Burton. 1996. Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Vol. 2, 3era. ed. Metcalf & Eddy, Inc. McGraw-Hill. México D. F. 1485 p.
- Thomson, W.W. 1975. The structure and function of salt glands. En: Pojkoff Mayber A, Gale J, (Eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medical and Aromatic Plant II*. Springer Verlag, Berlin, pp 118-48.
- Vajpayee, P., Sharma, S.C., Tripathi, R.D., Rai, U.N. y Yunus, M. 1999. Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera*. *Gaertn. Chemosphere* 39: 2159-2169.
- Verma, V.K., Tewari, S., Rai, J.P.N. 2008. Ion exchange during heavy metal biosorption from aqueous solution by dried biomass of macrophytes. *Biores. Technol.* 99: 1932–1938.
- Vesk, P. y Allaway, W. 1997. Spatial variation of copper and lead concentrations of water hyacinth plants in a wetland receiving urban run-off. *Aquat. Bot.* 59: 33-44.
- Volesky, B. 2007. Biosorption and me. *Water research*. 41: 4017 – 4029.
- Vymazal, J. 2011. Constructed wetlands for wastewater treatment: Five decades of experience. *Environ. Sci. Technol.* 45, 61-69.
- Vymazal, J. y Kröpfelová, L. 2005. Growth of *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* in constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic. *Ecol. Eng.* 25, 606-621.

- Vymazal, J. y Kröpfelova', L. 2008. Wastewater Treatment in Constructed Wetlands with Horizontal Sub-Surface Flow; Springer: Dordrecht.
- Wahl, S., Ryser, P. y Edwards, P.J. 2001. Phenotypic plasticity of grass root anatomy in response to light intensity and nutrient supply. *Ann. Bot.* 88: 1071-1078.
- Walpole, R., Myers, R. y Myers, S. 1999. Probabilidad y estadística para ingenieros. 6ª. ed. Prentice Hall Hispanoamericana. México. 752 p.
- Wang, G.X. 1995. Biosorption of Heavy Metal Iron from Aqueous Solution by Non-Living Water Hyacinth Roots, PhD Thesis, University of Nevada, Reno, Reno, N.V.
- Wang, P., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, K., Toda, K. y Ohtake, H. 1989. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1665–1669.
- Weiher, E. y P.A. Keddy (1995). The assembly of experimental wetland plant communities *Oikos.* 73: 323-335.
- Weisner, S., Eriksson, P., Granéli, W. y Leonardson, L. 1994. Influence of macrophytes on nitrate removal in wetlands. *Ambio.* 23(6): 363-366.
- Westlake, D.F. 1974. Macrophytes. En: R.A. Vollenweider (Ed.), *A Manual on Methods for Measuring Primary Production in Aquatic Environments*, IBP Handbook N° 12, 2nd ed., International Biological Programme, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 32-42. .
- Wetzel, R.G. y Corners, H. 1979. The role of the littoral zone and detritus in lake metabolism. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 13: 145-161.
- White, S.D. y Ganf, G.G. 2001. The influence of convective flow and sediment type on root morphology in *Typha domingensis*. *Aquat. Bot.* 70: 151–161.
- Williams, L.E., Pittman, J.K. y Hall, J.L. 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465:104-126.
- Wolverton, B.C. 1987. Aquatic plants for wastewater treatment: an overview. En: *Aquatic plants for water treatment and resource recovery* (Reddy, K. R y Smith, W. H. Eds.), p. 1-7.
- Wolverton, B.C. y Mc Donald, R.C. 1979. The water hyacinth: from prolific Pest to potential provider. *Ambio.* 8 (1): 2-9.
- Xie, Y. y Yu, D. 2003. The significance of lateral roots in phosphorus acquisition of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Aquat. Bot.* 75: 311-321.
- Xu, W., Shi, W., Yan, F., Zhang, B. y Liang, J. 2011. Mechanisms of cadmium detoxification in cattail (*Typha angustifolia* L.). *Aquat. Bot.* 94: 37-43.

- Yadav, S. y Chandra, R. 2010. heavy metals accumulation and ecophysiological effect on *Typha angustifolia* L. and *Cyperus esculentus* L. growing in distillery and tannery effluent polluted natural wetland site, Unnao, India. Environ. Earth Sci. DOI 10.1007/s12665-010-0611-6.
- Ye, Z.H., Baker, A.J.M., Wong, M.H. y Willis, A.J. 1997. Copper and nickel uptake, accumulation and tolerance in populations of *Typha latifolia* L. New Phytol. 136: 469-480.

X. AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (U.N.L) por otorgarme la posibilidad de realizar la carrera de doctorado y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

A mi directora, Dra. Ma. Alejandra Maine, y codirector, Dr. Hernán R. Hadad por el constante asesoramiento prestado durante la realización de esta tesis, a mi compañera y amiga Lic. Gisela Di Luca por la ayuda recibida durante todo el trabajo de Tesis, MSc. Gabriela Sánchez, MSc. Sandra Caffaratti y Lic. María del Carmen Pedro, del Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral por la ayuda prestada durante los análisis de muestras.

En especial, a mi familia y amigos por su apoyo incondicional.