

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

## Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis presentada para acceder al grado académico de Doctor en Ciencias  
Biológicas

**Modificaciones producidas por metales pesados sobre los parámetros  
fisiológicos y el sistema detoxificante de la macrófita *Eichhornia  
crassipes* que crece en humedales construidos para tratamiento de  
efluentes.**

Lic. en Biotecnología

González César Iván

Director de Tesis: Dra. María Alejandra Mainé

Co-director de Tesis: Dra. Jimena Cazenave

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

- 2015 -

## **TESIS DOCTORAL**

**Modificaciones producidas por metales pesados sobre los parámetros fisiológicos y el sistema detoxificante de la macrófita *Eichhornia crassipes* que crece en humedales construidos para tratamiento de efluentes.**



**González César Iván**

**2015**

*A mis padres y hermano*

*A mi hijo*

**ÍNDICE**

# 1 ÍNDICE

	Páginas	
1	ÍNDICE	5
2	AGRADECIMIENTOS	8
3	TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA TESIS	9
4	RESUMEN	12
5	ABSTRACT	15
6	ABREVIATURAS	18
7	FIGURAS Y TABLAS	20
8	INTRODUCCIÓN	25
8.1	Contaminación de aguas con metales pesados	25
8.2	Utilización de humedales construidos para el tratamiento de efluentes en presencia de metales pesados	26
8.3	Característica de la macrófita modelo utilizada	28
8.4	Características de los metales a ser estudiados	30
8.5	Toxicidad de metales en plantas	32
8.5.1	Estrés oxidativo	36
8.5.2	Defensa de las plantas ante el estrés oxidativo	41
8.6	Antecedentes sobre efectos fisiológicos y bioquímicos en <i>E. crassipes</i> expuesta a metales pesados.	44
9	OBJETIVOS	47
9.1	Objetivo General	47
9.2	Objetivos específicos	47
10	HIPÓTESIS	48
11	MATERIALES Y MÉTODOS	50
11.1	Diseño Experimental	50
11.2	Determinaciones analíticas	54
11.2.1	Determinaciones de parámetros fisicoquímicos en agua	54
11.2.2	Determinación de metales en tejidos de plantas	55
11.2.3	Determinación de pigmentos fotosintéticos	56
11.2.4	Determinación de enzimas antioxidantes	56
11.2.5	Determinación de peroxidación lipídica	57
11.3	Tratamiento estadístico de los resultados	58
12	CAPÍTULO I	60
12.1	Experiencia N° 1: Acumulación de Cr (III) y sus efectos sobre <i>Eichhornia crassipes</i>	60

12.1.1	Introducción	60
12.1.2	Metodología	60
12.1.3	Resultados	61
12.1.4	Discusión	66
12.2	Experiencia N° 2: Acumulación de Ni (II) y sus efectos sobre <i>Eichhornia crassipes</i>	69
12.2.1	Introducción	69
12.2.2	Metodología	70
12.2.3	Resultados	70
12.2.4	Discusión	76
12.3	Experiencia N° 3: Acumulación de Zn (II) y sus efectos sobre <i>Eichhornia crassipes</i>	79
12.3.1	Introducción	79
12.3.2	Metodología	79
12.3.3	Resultados	79
12.3.4	Discusión	85
13	CAPÍTULO II	89
13.1	Introducción general	89
13.2	Experiencia N° 1: Influencia de la presencia de nutrientes en la acumulación y efectos de Cr (III) sobre <i>Eichhornia crassipes</i>	90
13.2.1	Metodología	91
13.2.2	Resultados	91
13.2.3	Consideraciones finales de la experiencia N° 1	97
13.3	Experiencia N° 2: Influencia de la presencia de nutrientes en la acumulación y efectos de Ni (II) sobre <i>Eichhornia crassipes</i>	98
13.3.1	Metodología	98
13.3.2	Resultados	98
13.3.3	Consideraciones finales de la experiencia N° 2	105
13.4	Experiencia N° 3: Influencia de la presencia de nutrientes en la acumulación y efectos de Zn (II) sobre <i>Eichhornia crassipes</i>	106
13.4.1	Metodología	106
13.4.2	Resultados	106
13.4.3	Consideraciones finales de la experiencia N° 3	112
13.5	Discusión Capítulo II	114
14	CAPÍTULO III	119
14.1	Introducción general	119
14.1.1	Metodología	120
14.1.2	Resultados	120

14.2	Discusión Capítulo III	129
15	CONCLUSIONES	133
16	BIBLIOGRAFÍA	136
16.1	Trabajos aceptados para su publicación	136
16.2	Presentaciones en Reuniones Científicas	153
16.3	Libros y capítulos de libros	153

## 2 AGRADECIMIENTOS

Un trabajo de tesis doctoral representa un logro personal en el que participan muchísimas personas, por lo que me resulta imprescindible recordar a todos aquellos que lo hicieron posible.

En primer lugar, 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 familia, mis viejos y mi hermano, principales actores de este logro, por estar todos los días cerca de mí, confiando, apoyando mis decisiones y brindándome un empujón cuando lo necesitaba.

A mi directora de tesis, Dra. Alejandra Maine, por haber confiado en mí, desde el primer día y aun habiendo transcurrido tropezones y caídas. Por transmitirme su entusiasmo, dedicación, consejos y un toque de locura por la ciencia, siendo más que una directora de tesis, para mí.

A mi co-directora, Dra. Jimena Cazenave, por ser un ejemplo de investigadora. Por participar en la elaboración de este trabajo, por sus acertados consejos y por haberme tenido tanta paciencia.

He tenido la suerte de realizar una estancia durante esta Tesis, en el grupo de la Dra. Patricia Benavides, donde aprendí mucho en poco tiempo, tanto en lo profesional como en lo humano. A todo ese grupo les agradezco por haberme brindado confianza, un lugar de trabajo, por su generosidad en dedicarme su tiempo, energía y su magnífica comprensión y paciencia.

Y como olvidarme de ellos, con los que conviví estos 5 años de trabajo: a todo el grupo de la Cátedra de Química Analítica de la Facultad de Ingeniería Química: Hernán, Gabriela, Marita, Sandra, Gisela, Mercedes, Nahuel, Marcelo. Todos ellos juntos influyeron de una u otra manera en mi decisión de continuar con esta investigación.

Y por último y no menos importante: los amigos. Sí, ellos también son parte de este logro, estuvieron ahí cuando necesité una risa, un llanto, un empujón y también para compartir los pequeños logros. No me alcanzaría la página para escribir sus nombres, pero ellos saben bien quiénes son.



### 3 TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

Parte de los resultados de este trabajo de tesis doctoral han sido comunicados en reuniones científicas:

1- **13 al 15 de Noviembre de 2011.** “*VIII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO*”.

Lugar: Buenos Aires.

Título de Resumen:

**González, C.I.**; Cazenave, J.; Maine, M.A. “*Efectos tóxicos producidos por cromo, níquel y zinc en *Eichhornia crassipes**”.

2- **28 de Mayo al 1 de Junio de 2012.** “*Argentina y Ambiente 2012: I Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental y I Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental*”.

Lugar: Mar del Plata.

Título de Resumen:

**C. I. González**, J. Cazenave, M. P. Benavides y M. A. Maine. “*Respuesta Fisiológica de *Eichhornia Crassipes* ante la Presencia de Cromo, Níquel y Zinc*”.

3- **29 de Octubre al 9 de Noviembre de 2012.** “*48<sup>th</sup> Annual Meeting. Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology*”.

Lugar: Mendoza.

Título de Resumen:

**González CI**, Sánchez GC, Cazenave J, Benavides MP, Maine MA. “*Bioaccumulation, translocation and physiological effects of Cr (III) in *Eichhornia crassipes**”.

4- **13 al 17 de Octubre de 2013.** “*WETPOL 2013: 5<sup>th</sup> International Symposium on Wetland Pollutant Dynamics and Control*”.

Lugar: Nantes (Francia).

Título de Resumen:

**González C.I.**, Maine M.A., Sanchez G.C., Benavides P. *Nickel accumulation and its effects on *Eichhornia crassipes**”.

5- **20 al 23 de Octubre de 2013.** “CAIQ2013 - VII Congreso Argentino de Ingeniería Química”.

Lugar: Rosario.

Título de Resumen:

G. C. Sánchez, N. E. Camaño Silvestrini, **C. I. Gonzalez**, M. C. Pedro, S. E. Caffaratti, H. R. Hadad, M. A. Maine. “*Rol de macrófitas en la remoción de contaminantes de un lixiviado de relleno sanitario utilizando un wetland construido subsuperficial*”.

6- **9 al 12 de Junio de 2014.** “II Conferencia Panamericana de sistemas de humedales para el manejo, tratamiento y mejoramiento de la calidad de agua”.

Lugar: Morelia, Michoacán (México).

Título de Resumen:

**González C.I.**, Cazenave J., Maine M.A., Benavides P. “*Zinc: sorción, estrés oxidativo y peroxidación lipídica en Eichhornia crassipes*”

Parte de los resultados de este trabajo de tesis doctoral han sido publicados en revistas internacionales con referato:

**González, C.I.**, Maine, M.A., Cazenave, J., Sanchez, G.C., Benavides, M.P. 2014. *Physiological and biochemical responses of Eichhornia crassipes exposed to Cr (III)*. Environ. Sci. Pollut. Res. DOI: 10.1007/s11356-014-3558-4

**González, C.I.**, Maine, M.A., Cazenave, J., Hadad, H.R., Benavides, M.P. 2015. *Ni accumulation and its effects on physiological y biochemical parameters of Eichhornia crassipes*. Environ. Exp. Bot. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2015.04.006.

**RESUMEN**

## 4 RESUMEN

En esta tesis se evaluó si metales pesados (Cr (III), Ni (II) y Zn (II)), en forma aislada y combinada, tanto en ausencia como en presencia de nutrientes (fósforo (P) y nitrógeno (N)), provocan modificaciones sobre parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo (defensa antioxidante y daño oxidativo), en la planta acuática *Eichhornia crassipes* que crece en humedales construidos para tratamiento de efluentes.

El trabajo fue dividido en tres capítulos que describen tres diferentes fases experimentales. El primer Capítulo presenta resultados relacionados con la respuesta de *E. crassipes* a la exposición, en corto tiempo, de los tres metales en forma aislada. El segundo Capítulo presenta resultados relacionados con la respuesta sobre parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo de *E. crassipes*, en presencia de metales pesados en combinación con nutrientes (P y N). El tercer Capítulo profundiza en los cambios fisiológicos y de estrés oxidativo producidos por la presencia de metales pesados en forma combinada y con el agregado de nutrientes (P y N).

En el Capítulo I, los resultados muestran que hubo un aumento de la concentración de los metales en los tejidos de la planta con el aumento de la concentración del metal en agua y los tiempos de exposición. Por otro lado, la mayor acumulación de los metales, se produjo principalmente en las primeras 24 hs y en raíz. Además, la exposición a corto tiempo de las concentraciones ensayadas para los tres metales, produjeron cambios fisiológicos favorables que demostrarían una continuidad en la actividad fotosintética de la *E. crassipes*. En general, *E. crassipes*, mostró la capacidad de incrementar rápidamente la respuesta de su defensa enzimática antioxidante, ante la exposición a cortos tiempos y diferentes concentraciones de los metales, para asegurar su homeostasis redox. Sin embargo, el daño a lípidos, medido por la concentración de malondialdehído (MDA), indicaría la presencia de un estrés oxidativo moderado, tanto en raíces como en parte aérea, siendo el Cr el que mayor efecto tóxico ejerce, particularmente sobre la raíz.

En el Capítulo II, los resultados muestran que existió una influencia sobre la sorción de los metales al agregar nutrientes al medio. Por un lado, la sorción de Cr y Zn se vio disminuida, mientras que sobre la de Ni, no tuvo efecto. En cuanto a los parámetros fisiológicos, la presencia de nutrientes permitió el incremento de las concentraciones de pigmentos fotosintéticos en las exposiciones a Cr y Zn, no así para la exposición a Ni, donde se observó el mayor daño fotosintético. Por último, los nutrientes provocaron un aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes, pero sin lograr una disminución de la peroxidación lipídica provocada por la exposición a Ni y Zn, no así para Cr. En este

último caso, la presencia de nutrientes favoreció la disminución de la concentración de MDA mediante la activación del mecanismo de defensa enzimático antioxidante.

En el último Capítulo se observó que en el tratamiento con combinación de los metales Cr+Ni y en Cr+Ni+Zn (en ausencia y presencia de nutrientes), la concentración de los metales disminuyó en comparación a los tratamientos con los metales aislados. En cuanto a los efectos sobre *E. crassipes* al ser expuesta a combinación de metales, en los tratamientos con Cr+Ni, se observó una disminución de las concentraciones de pigmentos fotosintéticos y una disminución de las actividades de las enzimas antioxidantes. Esta respuesta se ve marcadamente relacionada al efecto provocado por Ni. La presencia de nutrientes en este tratamiento no favoreció la respuesta de la planta. En cuanto al tratamiento con Cr+Ni+Zn, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, se observó un aumento de la concentración de clorofilas y carotenoides y un aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes, respecto del tratamiento binario Cr+Ni. La presencia de Zn produjo una mejor respuesta de *E. crassipes* a los metales, activando el sistema de defensa antioxidante.

Concluyendo, se observó que *E. crassipes* demuestra una alta plasticidad, ya que, incrementó la actividad de sus enzimas antioxidantes en respuesta a la presencia de metales pesados y sus efectos de stress oxidativo. Por otro lado, el agregado de nutrientes favorecería la continuidad de la actividad fotosintética, mientras que la presencia de metales pesados (como Zn) a bajas concentraciones permitiría el incremento en la capacidad de la respuesta enzimática antioxidante, permitiendo un menor daño oxidativo.

**ABSTRACT**

## 5 ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate if heavy metals Cr (III), Ni (II) and Zn (II), in isolation or in combination, both in absence and presence of nutrients (phosphorus (P) and nitrogen (N)) cause changes on physiological parameters and oxidative stress (oxidative damage and antioxidant defense) in the macrophyte *Eichhornia crassipes* growing in constructed wetlands for wastewater treatment.

This work was divided in three Chapters describing three different experimental phases. The first Chapter presents results concerning the response of *E. crassipes* to each metal exposure, in a short period of treatment. The second Chapter presents results related to the physiological and antioxidative response of *E. crassipes* exposed to heavy metals in combination with nutrients (P and N). The third Chapter discusses the physiological and oxidative stress changes caused observed in *E. crassipes* treated with a combination of the three heavy metals and the addition of P and N.

In Chapter I, results show that there was an increment of metals concentration in plant tissues subjected to increasing metal concentration in the water and increasing exposure times. On the other hand, the greater metal accumulation mainly occurred in the first 24 hours in root. In addition, short time exposure to the three metals, produced favorable physiological changes that would demonstrate continuity in the photosynthetic activity on *E. crassipes*. In general, *E. crassipes* showed the ability to increase the response of antioxidant defense, when exposed to short times and different metals concentrations to ensure their redox homeostasis. However, damage to lipids, measured by the concentration of malondialdehyde (MDA), indicate the presence of a moderate oxidative stress both in root and aerial part, being Cr which exerts higher toxic effect, particularly on the root.

In Chapter II, results show that the addition of nutrients had influence on the sorption of metals. Cr and Zn sorption was decreased, whereas there was no effect on Ni. In relation to physiological parameters, the presence of nutrients increased the concentration of photosynthetic pigments when plants were exposed to Cr and Zn, but not for Ni exposure, where a photosynthetic greater damage was observed. Finally, the nutrients increased the activities of antioxidant enzymes, but without reduction

of the lipid peroxidation caused by Ni and Zn. In the case of Cr treatment, the presence of nutrients decreased MDA concentration by activating the enzymatic antioxidant defense mechanism.

In the last Chapter we observed that metals concentration in treatments with a combination of Cr+Ni and Cr+Ni+Zn (in the absence and presence of nutrients), decreased compared to treatments with each metal alone. When *E. crassipes* was exposed to a combination of metals, treatments with Cr+Ni, showed a decrease of photosynthetic pigments concentrations and a reduction of antioxidant enzymes activities. This response was markedly related to Ni-induced effect. The presence of nutrients in this treatment did not help the plant response. On treatment with Cr+Ni+Zn, in presence or absence of nutrients, increase chlorophyll and carotenoids concentrations and antioxidant enzyme activities respect of binary treatment (Cr+Ni) were observed. The presence of Zn produced the best response of *E. crassipes* to metals, activating the antioxidant defense system.

Concluding, it was found that *E. crassipes* shows a high plasticity, because it increased antioxidant enzymes activities in response to the presence of heavy metals and their effects of oxidative stress. Furthermore, the addition of nutrients could promote the continuity of photosynthetic activity. While the presence of heavy metals (as Zn) at low concentrations would allow an increase of enzymatic antioxidant response capacity, allowing less oxidative damage.



## **ABREVIATURAS**

## 6 ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA (siglas en inglés): Análisis de la varianza

APX: Ascorbato peroxidasa

ASC: Ascorbato reducido

CAT: Catalasa

DE: Desviación estándar

DHA: Dehidroascorbato

DHAR: dehidroascorbato reductasa

DTE: Dithiothreitol

EDTA: Etilendiaminotetraacético

FTIR (siglas en inglés): Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier

FWS (siglas en inglés): Wetlands de flujo de agua superficial

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Disulfuro de glutación (glutación oxidado)

HSSF (siglas en inglés): Wetlands de flujo de agua sub-superficial horizontal

IUPAC (siglas en inglés): Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

MDA: Malondialdehído

MDHA: monodehidroascorbato

MDHAR: Monodehidroascorbato reductasa

MnSOD: Mn-superóxido dismutasa

N: Nitrógeno

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido en forma oxidada

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida

NO: Óxido nítrico

P: Fósforo

POD: Guaiacol peroxidasa

ROS (siglas en inglés): Especies reactivas de oxígeno

SOD: Superóxido dismutasa

TBA (siglas en inglés): Ácido tiobarbitúrico

USEPA (siglas en inglés): Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos

VF (siglas en inglés): Wetlands de flujo de agua vertical

WC: Wetlands construidos

**FIGURAS Y TABLAS**

## 7 FIGURAS Y TABLAS

### 8 Introducción

**Figura 1:** *Eichhornia crassipes* - Imagen por Forest & Kim Starr (*Starr Environmental*).

**Figura 2:** Curva dosis-respuesta del crecimiento de plantas. (a) Respuesta frente a metales pesados esenciales. (b) Respuesta frente a metales pesados no esenciales (adaptada de Shaw y col., 2004).

**Tabla 1:** Principales funciones de elementos traza que son esenciales para las plantas (tomada de Kabata-Pendias, 2000).

**Tabla 2:** Mecanismos de defensa generales de las plantas a nivel extracelular e intracelular (tabla adaptada de Macnair, 1997).

**Figura 3:** Respuesta de las plantas frente a la concentración de metales en agua, adaptada de Greger (2004).

**Figura 4:** Esquema de los diferentes estados de oxidación del oxígeno. Se muestra en la columna de la derecha con una flecha, el spin que presentan los electrones de la última capa de cada uno de los radicales.

**Tabla 3:** Procesos de producción de especies reactivas de oxígeno en plantas. Modificado de Mittler (2002).

**Tabla 4:** Procesos de eliminación de especies reactivas de oxígeno en plantas. Modificado de Mittler (2002).

**Figura 5:** Esquema del proceso de peroxidación lipídica.

**Tabla 5:** Clasificación de los sistemas enzimáticos.

**Figura 6:** Esquema de algunas de las enzimas implicadas en la defensa frente a las ROS. SOD superóxido dismutasa; POD peroxidasas; CAT catalasa; APX ascorbato peroxidasa; MDHAR monodehidroascorbato reductasa; DHAR dehidroascorbato reductasa; GR glutatión reductasa; ASC ascorbato reducido; MDHA monodehidroascorbato; DHA dehidroascorbato; GSH glutatión reducido; GSSG glutatión oxidado.

### 11 Materiales y Métodos

**Figura 7:** Foto satelital del lugar de campaña (extraída de Google Earth).

**Figura 8:** Fotografías de la cámara de cultivo.

**Tabla 6:** Caracterización fisicoquímica del agua utilizada en los experimentos, (ND = no detectado, LD = límite de detección).

**Figura 9:** Esquema de las experiencias del **Capítulo I**.

**Figura 10:** Esquema de las experiencias del **Capítulo II**.

**Figura 11:** Esquema de las experiencias del **Capítulo III**.

## **12 Capítulo I**

**Figura I.1:** Acumulación de Cr en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.2:** Acumulación de Cr en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.3:** Efectos del Cr sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.4:** Efectos del Cr sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en parte aérea y raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.5:** Efectos del Cr sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en parte aérea y raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.6:** Acumulación de Ni en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.7:** Acumulación de Ni en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.8:** Efectos del Ni sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.9:** Efectos del Ni sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en parte aérea y raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.10:** Efectos del Ni sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en parte aérea y raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.11:** Acumulación de Zn en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.12:** Acumulación de Zn en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.13:** Efectos del Zn sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.14:** Efectos del Zn sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en parte aérea y raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura I.15:** Efectos del Zn sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en parte aérea y raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

## **13 Capítulo II**

**Figura II.1:** Acumulación de Cr en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Cr, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.2:** Acumulación de Cr en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Cr, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.3:** Efectos de diferentes concentraciones de Cr sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.4:** Efectos del Cr sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.5:** Efectos del Cr sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.6:** Acumulación de Ni en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Ni, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.7:** Acumulación de Ni en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Ni, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.8:** Efectos de diferentes concentraciones de Ni sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.9:** Efectos del Ni sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.10:** Efectos del Ni sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.11:** Acumulación de Zn en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Zn, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.12:** Acumulación de Zn en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Zn, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.13:** Efectos de diferentes concentraciones de Zn sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.14:** Efectos del Zn sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura II.15:** Efectos del Zn sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

### **14 Capítulo III**

**Figura III.1:** Acumulación de Cr y Ni en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes tratamientos, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura III.2:** Acumulación de Cr y Ni en raíz de *E. crassipes* a diferentes tratamientos, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura III.3** Efectos sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos en *E. crassipes* a diferentes tratamientos, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura III.4:** Efectos sobre las actividades de las enzimas antioxidantes en *E. crassipes*, expuesta a diferentes tratamientos, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

**Figura III.5:** Efectos del Zn sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

# **INTRODUCCIÓN**



## 8 INTRODUCCIÓN

### 8.1 Contaminación de aguas con metales pesados

El agua es, fue y será un elemento indispensable para los seres vivos, ya que es fuente y sustento de vida. Además, es base para el desarrollo de muchas de las actividades que realiza el hombre, siendo el ser humano la especie que más consume este recurso.

La población mundial va en aumento, por lo cual, el uso y la demanda de este preciado recurso se ha vuelto esencial. Su uso desordenado y descuidado en múltiples actividades conlleva a su contaminación con diversas sustancias. Es por esto que, la cantidad de agua disponible para consumo va en disminución, ya que la contaminación provoca la pérdida de gran parte de sus propiedades fisicoquímicas. Desde hace años los esfuerzos para lograr la eliminación de los contaminantes generados por el hombre no han sido capaces de ajustarse ni al ritmo de incremento en la cantidad de desechos industriales, ni al crecimiento demográfico.

Desde el comienzo de la Revolución Industrial, los metales han penetrado lentamente en el ambiente, ocasionando que se acumulen progresivamente en suelos, sedimentos y aguas superficiales. Las fuentes antropogénicas de contaminación por metales son muy diversas, entre ellas tenemos: productos químicos agrícolas, actividades de minería y fundición, cenizas de la combustión de carbón y petróleo, aguas residuales industriales de diversos sectores, residuos urbanos e industriales, etc. (Förstner y Wittmann, 1983, Adriano, 1986). Actualmente es difícil encontrar una actividad industrial o un producto manufacturado en los que no intervenga algún metal (Förstner y Wittmann, 1983).

En los ambientes acuáticos, los metales se acumulan fundamentalmente en los sedimentos de fondo. Estos metales se encuentran en forma aislada o combinados formando minerales (Vega y Reynaga, 1990). En la actualidad, los términos metal o metal pesado están siendo utilizados de forma generalizada. Sin embargo, no existe una definición del término metal pesado ampliamente aceptada por la comunidad científica que haya sido formulada por alguna institución de reconocido prestigio como la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, siglas en inglés) y que clasifique este grupo de metales a partir de sus propiedades físico-químicas (Duffus, 2002).

Los metales pesados han sido reconocidos como peligrosos para la salud del hombre y la biota acuática, dados los impactos negativos que pueden generarse incluso cuando estos se encuentran en concentraciones muy bajas. La presencia de elevadas concentraciones de estos contaminantes en el agua, así como la falta de tratamiento de los mismos, traen como consecuencia el daño a los

ecosistemas, enfermedades al ser humano, pérdida de especies, falta de suministro de agua potable, intoxicación de peces, problemáticas sociales y demás efectos negativos. Al contrario de muchos contaminantes orgánicos los metales pesados, generalmente, no se eliminan de los ecosistemas acuáticos por procesos naturales debido a que no son biodegradables (Murray, 1996). Los principales problemas de la presencia de metales pesados en el agua son la bioacumulación y la biomagnificación. El término bioacumulación hace referencia al proceso por el cual la concentración química de una sustancia en un organismo acuático alcanza un nivel que supera a la concentración en el agua, como resultado de la absorción a través de todas las rutas posibles (Alexander, 1999). Mientras que, se entiende por biomagnificación a la tendencia a acumularse a lo largo de la cadena trófica, exhibiendo concentraciones sucesivamente crecientes al ascender el nivel trófico (Alexander, 1999).

Se han implementado diversas técnicas para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados, con el objetivo de hacerlas reutilizables. Actualmente, las investigaciones en el campo del tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados mediante tecnologías no convencionales, ha desembocado en el diseño, construcción y puesta en marcha de diversos sistemas: lagunas de oxidación, filtros verdes, humedales construidos, etc. Todos estos no son más que ecosistemas donde procesos físicos, químicos y biológicos juegan un papel importante que permiten la eliminación de nutrientes, materia orgánica, trazas de metales pesados y agente patógenos, reduciéndose los posibles efectos adversos de los vertidos sobre los medios receptores.

Los humedales construidos son los que están experimentando un mayor grado de desarrollo e implantación, resultando una opción a tener en cuenta a la hora de obtener un agua con una buena calidad, debido principalmente a su elevada eficiencia en la remoción.

## **8.2 Utilización de humedales construidos para el tratamiento de efluentes en presencia de metales pesados**

Los humedales naturales han sido con frecuencia los receptores de muchos de los residuos generados por el hombre, gracias a su conocida capacidad de autodepuración. El siglo XX trajo el desarrollo de sistemas de humedales construidos (WC = wetlands construidos), diseñados por el hombre para enfatizar características específicas de los humedales naturales, con el objeto de mejorar la eficiencia del sistema. La USEPA (1998) define a los humedales construidos como sistemas complejos e integrados en los que tienen lugar interacciones entre el agua, plantas, microorganismos, energía solar, suelo y aire; con el propósito de mejorar la calidad del agua residual y proveer una mejora ambiental.

El hecho de que tienen un bajo costo inicial de construcción, es que la tecnología de wetlands construidos se ha convertido en una de las formas de tratamiento de efluentes cada vez más difundida en los últimos años (Kadlec y Wallace, 2009). Además, pueden construirse donde se necesitan, dimensionarse de acuerdo a las necesidades del tratamiento, impermeabilizarse para evitar la contaminación de las napas y tienen un bajo costo anual de funcionamiento.

Existen tres tipos de wetlands construidos (Kadlec y Wallace, 2009):

✓ Los wetlands de flujo de agua libre o de agua superficial (FWS, según sus siglas 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.

✓ Los wetlands de flujo sub-superficial horizontal (HSSF, según sus siglas en inglés), que normalmente utilizan una lecho de grava sembrada con plantas enraizadas. El agua, que se mantiene por debajo de la superficie del 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 sus siglas 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.

El wetland más adecuado a utilizar se elige de acuerdo al tipo de efluente, al caudal, a los contaminantes a eliminar, etc. Los wetlands de flujo superficial son los más utilizados para la depuración de efluentes conteniendo metales pesados.

En Argentina, el uso de wetlands para tratamiento de efluentes es aún muy limitado a pesar de sus ventajas. Los trabajos publicados sobre wetlands construidos en nuestro país son de nuestro grupo de trabajo, que ha estudiado la respuesta de wetlands naturales y construidos, a los contaminantes, dedicándose al estudio de wetlands de flujo superficial para la depuración de efluentes industriales

(Maine y col., 2006, 2007, 2009, 2013, Hadad y col., 2006, 2007, 2010, 2011, Mufarrege y col., 2010, 2011, 2014, Di Luca y col., 2011a, b, 2014). El primer wetland que se diseñó y se continúa monitoreando, tiene 13 años de operación. Fue construido en la ciudad de Santo Tomé, Santa Fe (Argentina), en una industria metalúrgica, para tratar sus efluentes, los cuales presentan alto pH y conductividad y contienen Cr (III), Ni (II) y Zn (II) (efluente industrial) y P y N (efluente cloacal), en forma conjunta. Inicialmente, se trasplantaron varias especies de macrófitas. *Eichhornia crassipes* llegó a ser la especie dominante durante los primeros años de operación.

### **8.3 Característica de la macrófita modelo utilizada**

Las macrófitas han sido utilizadas para la diagnosis o predicción de las consecuencias negativas de actividades antropogénicas mediante el estudio de sus procesos fisiológicos, respuestas bioquímicas, mecanismos de adaptación y mortalidad. Las respuestas que tienen lugar en estas plantas acuáticas como consecuencia del efecto de un contaminante se han denominado biomarcadores (Brain y Cedergreen, 2009). Éstos pueden definirse como las variaciones bioquímicas, celulares, fisiológicas o comportamentales que pueden ser medidas en el tejido y/o a nivel del organismo completo y brindan evidencia de la exposición a uno o más componentes químicos (Prasad, 2004). Los biomarcadores ofrecen información completa y biológicamente relevante sobre el potencial impacto de los contaminantes tóxicos en la salud de los organismos. Tienen la ventaja de poner en evidencia síntomas tempranos del daño causado por el contaminante y, por tanto, pueden ser utilizados como señales de alarma ante la presencia de contaminantes químicos.

Por otro lado, estas plantas acuáticas son el componente biológico principal de los humedales y se han convertido en una cuestión central no solo en estrategias de conservación de humedales naturales sino en la optimización de la eficiencia de wetlands construidos. Además de asimilar los contaminantes directamente en sus tejidos, actúan como un catalizador para las reacciones de purificación, aumentando la diversidad del ambiente en la zona de las raíces y promoviendo una variedad de reacciones químicas y bioquímicas que mejoran la purificación (Jenssen y col., 1993).

Es necesario encontrar plantas autóctonas que en las condiciones ambientales donde se va a llevar a cabo el tratamiento del efluente, presenten alta tolerancia y capacidad de remoción de los contaminantes. El valle aluvial del río Paraná Medio, donde nos encontramos, cuenta con numerosos humedales naturales donde se desarrolla una abundante y variada vegetación acuática. En esta área se reconoce una zona litoral compuesta por vegetación emergente, otra zona más profunda, las cuales presenta macrófitas con hojas flotantes y una zona más interna donde se hayan las plantas sumergidas.

Estas plantas pueden usarse en humedales construidos ya que presentan la ventaja de estar adaptadas a las condiciones ambientales propias de la región.

Las especies generalmente empleadas en los sistemas de tratamiento de efluentes son las flotantes libres como *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* y *Lemna* sp. y emergentes como *Typha* sp. y *Scirpus* sp. Las macrófitas flotantes se han estudiado por su capacidad de remoción de contaminantes del agua y consiguiente utilización en los humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales (Delgado y col., 1993, Sen y Bhattacharyya, 1994, Banerjee y Sarker 1997, Maine y col., 2001, 2004, Hadad y col., 2006). De acuerdo a Brix (1997), los procesos que tienen lugar para la depuración de contaminantes con macrófitas flotantes se dan a través de tres mecanismos primarios: uno de ellos es la filtración y sedimentación de sólidos, otro, la incorporación de contaminantes a los tejidos vegetales y su posterior cosechado y un tercero, la degradación de la materia orgánica por un conjunto de microorganismos facultativos asociados a las raíces de las plantas y en los detritos del fondo del wetland, dependiendo del diseño.

El camalote (*E. crassipes*) es una macrófita acuática perenne de libre flotación, con alta reproducción y tasa de crecimiento, por lo cual se extiende rápidamente y forma tapetes o esteras (**Fig. 1**). *E. crassipes* es originaria de los trópicos, específicamente del Amazonia, Brasil (Barrett y Forno, 1982). Crece en todo tipo de aguas dulces, *non grata* en gran parte del mundo donde a menudo produce atascos de los ríos y lagos, debido a su capacidad de reproducción, llegando a duplicar su población en tan solo 6 días, según lo informado por Michell (1976). Se la considera una candidata ideal para su uso en la rizofiltración de elementos trazas tóxicos de una variedad de cuerpos de agua, debido a que el éxito económico de la fitorremediación en gran medida depende de la actividad fotosintética y la tasa de crecimiento de las plantas.



#### Taxonomía Científica

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Liliopsida
- Orden: Commelinales
- Familia: Pontederiaceae
- Género: *Eichhornia*
- Especie: *E. crassipes*

**Figura 1:** *Eichhornia crassipes* - Imagen por Forest & Kim Starr (*Starr Environmental*).

Se ha realizado una amplia investigación, llevada a cabo por diversos grupos de investigación, para estudiar el funcionamiento y la eficiencia de *E. crassipes* en la remoción de nutrientes (Desougi, 1984, Vora y Rao, 1988, Goel y col., 1989, Oke y Elmo, 1990, Soltan, 1999), minerales, químicos orgánicos y herbicidas de aguas contaminadas (Boyd, 1976, , Reddy y col., 1982, Reddy, 1983, Nora y Jesus, 1997, Xia y Ma, 2006, Fox y col., 2008) y metales pesados (Wolverton, 1975, Wolverton y McDonald, 1975, Muramoto y Oki, 1983, Vesik y Allaway, 1997, Vesik y col., 1999, Ali y Soltan, 1999, Soltan, 1999, Kelley y col., 2000, Lu y col., 2004, Gardea-Torresdey y col., 2005, Ebel y col., 2007, Mishra y Tripathi, 2009).

#### 8.4 Características de los metales a ser estudiados

Como se describió anteriormente, nuestro grupo de trabajo viene estudiando la respuesta de un wetland de flujo superficial, para la depuración de un efluente industrial con alta salinidad y pH, conteniendo metales pesados (Cr (II), Ni (II) y Zn (II)) y nutrientes (P y N). Por este motivo planteamos en esta tesis, trabajar con estos tres metales pesados, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, en forma aislada y combinada.

El *Cr* es un elemento natural ubicuo, que se encuentra en rocas, plantas, suelos, animales y en los humos y gases volcánicos. Es un elemento de transición, por lo que puede funcionar con distintas valencias, las más comunes son las derivadas del cromo trivalente, o Cr (III), y las del cromo hexavalente, o Cr (VI). El Cr es introducido en los ecosistemas naturales como resultado de diferentes

actividades industriales como la elaboración de pigmentos, baterías de alta temperatura, fungicidas, curtidos de pieles, industrias papeleras y demás actividades antropogénicas. Por su alta reactividad, el cromo metálico no se encuentra libre en la naturaleza. 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). 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. Altas concentraciones de Cr (VI) pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y entonces persistir como contaminantes. 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) (McGrath y Smith, 1990; Vajpayee y col., 1999). En el ambiente acuático, los compuestos del Cr (VI) se disuelven con facilidad, pero en condiciones naturales y en presencia de materia orgánica oxidable, se reducen rápidamente a compuestos de Cr (III) más estables y menos hidrosolubles (Facetti y col., 1998). No obstante, si el pH es menor a 5, el ion Cr (III) no precipita, manteniéndose en disolución.

El **Zn** es un metal muy abundante en la corteza terrestre. En aguas superficiales se encuentra en forma inorgánica, iónica o coloidal, siendo las especies más frecuentes  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}(\text{OH})^+$  y  $\text{ZnCl}_3^-$  (Taylor y Demayo, 1989). Es introducido en aguas residuales como resultado de su uso en aleaciones (por ej., bronce y latón), vulcanización del caucho, industrias textiles, fungicidas, laboratorios químicos y farmacéuticos, etc. (Haquenoer y Furon, 1981, Adriano, 1986). Según las características fisicoquímicas (por ej., pH, dureza del agua), los compuestos de metal zinc pueden ser tóxicos, particularmente en el ambiente acuático. Sin embargo, en los mismos, se encuentra principalmente como Zn (II). También puede encontrarse en los suelos, y es un nutriente requerido por las plantas para su desarrollo (Mahler, 2003). Es menos tóxico que el Cr y Ni (Newman, 1998).

El **Ni** que alcanza el medio ambiente lo hace siguiendo principalmente dos caminos: meteorización de minerales y rocas y como resultado de las actividades antropogénicas. Es utilizado en la producción de aceros inoxidables, aleaciones, niquelados, baterías alcalinas (Ni-Cd), pigmentos inorgánicos y otros (Adriano, 1986). El Ni en los sistemas acuáticos suele estar presente en su mayor parte en forma soluble y sólo una baja proporción forma complejos no muy estables. La movilidad y biodisponibilidad del Ni en medio acuoso están influenciadas por factores ambientales tales como el pH, el potencial de óxido-reducción y la presencia de materia orgánica y de material particulado inorgánico (Callahan y col., 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 (Adriano, 1986). Los óxidos de hierro y manganeso adsorben el  $\text{Ni}^{+2}$  y coprecipitan a pH mayor que 6 (CCME, 1996).

La interacción entre la acumulación de metales pesados en los tejidos de plantas y las concentraciones de nutrientes en el medio circundante, ha sido estudiada. Lee y Wang (2001) informaron que un aumento en la concentración de nitrato en agua resultó en un aumento significativo en la tasa de acumulación de Cd en *Ulva fasciata*, mientras que la tasa de acumulación de Cr (VI) y Zn no se vio afectada. La acumulación de Cd y Zn se correlacionó inversamente con la concentración de fosfato en agua, mientras que el Cr (VI) mostró la tendencia opuesta, lo que sugiere que la influencia de los principales nutrientes en la acumulación de metales era de metal específico. Göthberg y col. (2004) reportaron una mayor acumulación de metales en *Ipomoea aquatica* a menores concentraciones de nutrientes. Sundaramoorthy y col. (2010) estudiaron la correlación entre la acumulación de Cr y la absorción de nutrientes utilizando *Oryza sativa* L. y encontraron que la absorción de macronutrientes (N, P y K) y micronutrientes (Mn, Cu, Zn y Fe) disminuía gradualmente a medida que la concentración de Cr aumentaba. La interacción entre los metales y absorción de nutrientes es controvertida. Al parecer, esta interacción no es sólo de metal específico sino también específico de la especie.

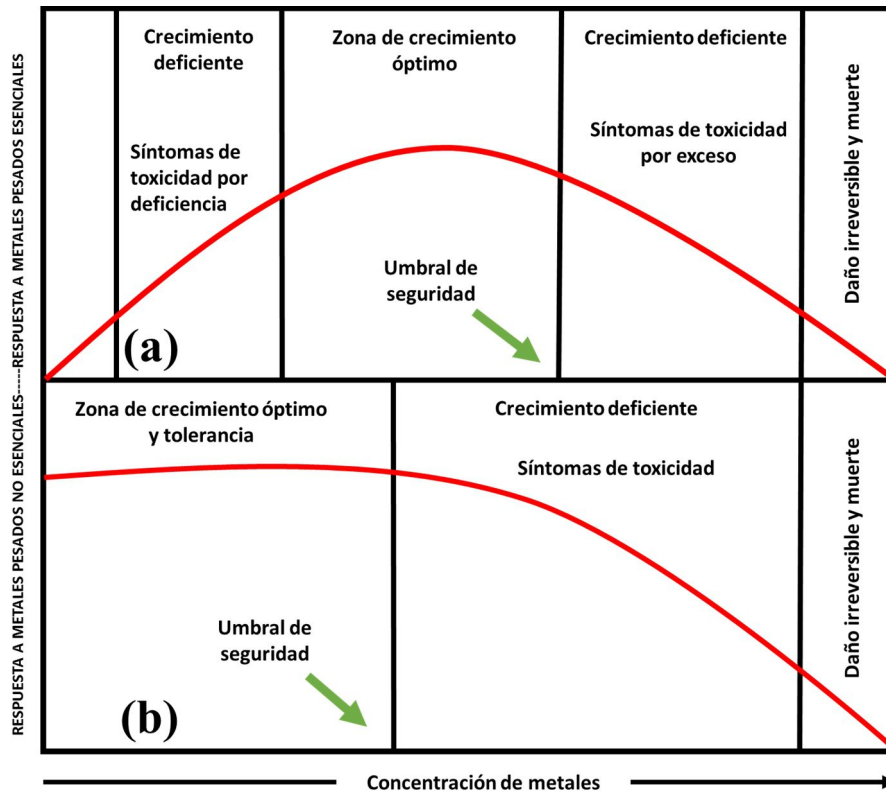
La acumulación y fitotoxicidad de los metales depende de la forma química en la que se encuentren en el medio, la persistencia, la concentración, la presencia de otros contaminantes y/o nutrientes y la especie vegetal. Sin embargo, cualquier elemento que comúnmente es indispensable para un organismo en concentraciones trazas, puede transformarse en tóxico a concentraciones excesivas.

## 8.5 Toxicidad de metales en plantas

El término metal pesado no es sinónimo de toxicidad. Las plantas requieren para su supervivencia una variedad de metales que, de forma genérica, se denominan “esenciales”, pues son requeridos a bajas concentraciones, como elementos nutricionales. Hay otros elementos que se han comprobado que son esenciales sólo para algunas especies y otros que se han comprobado que estimulan el crecimiento de las plantas, pero de los que no se conocen aún los procesos específicos en los que intervienen (Prasad, 2004). Por tanto, un elemento se define como esencial cuando no puede ser sustituido por otro por la especificidad en sus funciones bioquímicas y porque tiene una influencia directa en el organismo, el cual no puede crecer ni completar algún ciclo metabólico si este elemento no está presente (Kabata-Pendias, 2000). Los metales son incorporados a través de las raíces, como micronutrientes u oligoelementos. Sin embargo, los metales esenciales pueden ser tóxicos si su



concentración efectiva es muy elevada. Con alguna excepción, los metales pesados son no esenciales y por tanto, son tóxicos en la naturaleza aún a concentraciones muy bajas (Clijsters y col., 1999, Prasad, 2004). Tanto la deficiencia como el exceso de elementos esenciales afectan al desarrollo óptimo de la planta, como se muestra en la **Fig. 2**.



**Figura 2:** Curva dosis-respuesta del crecimiento de plantas. (a) Respuesta frente a metales pesados esenciales. (b) Respuesta frente a metales pesados no esenciales (adaptada de Shaw y col., 2004).

Algunos metales desempeñan funciones de gran importancia en el metabolismo de las plantas, como puede observarse en la **Tabla 1**.

Elemento	Forma parte de:	Implicancia metabólica
<i>Al</i>		Controla propiedades coloidales en la célula, posible activación de algunas deshidrogenasas y oxidasas
<i>B</i>	Fosfogluconatos	Metabolismo y transporte de carbohidratos, síntesis de flavonoides, síntesis de ácidos nucleicos, utilización del fosfato y producción de polifenoles

<b><i>Cu</i></b>	Varias oxidasas, plastocianinas y cenilplasminas	Oxidación, fotosíntesis, metabolismo de las proteínas y los carbohidratos, metabolismo de la pared celular
<b><i>Fe</i></b>	Hemoproteínas y ferredoxinas	Fotosíntesis, fijación del N <sub>2</sub> y cambios de valencia
<b><i>Mn</i></b>	Síntesis de varias enzimas	Fotoproducción de O <sub>2</sub> en el cloroplasto e indirectamente en la reducción del NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<b><i>Mo</i></b>	Nitrato reductasa, nitrogenasas y oxidasas	Fijación del N <sub>2</sub> en simbiosis, posiblemente también en plantas sin nódulos
<b><i>Zn</i></b>	Anhidrasas, deshidrogenasas, proteinasas y peptidasas	Metabolismo de lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos
<b><i>Ni</i></b>	Ureasa	N-metabolismo y fijación biológica de N

**Tabla 1:** Principales funciones de elementos traza que son esenciales para las plantas (tomada de Kabata-Pendias, 2000).

Los metales cuya concentración se encuentran en exceso en las células vegetales pueden producir cambios de permeabilidad en las membranas celulares (Ag, Au, Br, Cd, Cu, Fe, Hg, I, Pb), reaccionar con los grupos tioles (Ag, Hg, Pb), competir por sitios específicos con metales esenciales (As, Sb, Se, Te, W, Fe) o sustituir iones esenciales (Cs, Li, Rb, Se, Sr) entre otros efectos (Kabata-Pendias, 2000).

Desde un punto de vista ambiental, no todos los metales producen la misma respuesta en las plantas, ni todas las plantas responden de la misma manera frente al mismo metal. Una vez en el interior de la raíz, y por tanto en el tejido vegetal, los metales causan daños a las plantas a través de distintos mecanismos (Ochiai, 1987):

- ✓ bloqueando los grupos funcionales de moléculas de importancia biológica, como enzimas, polinucleótidos o sistemas de transporte de iones,
- ✓ desplazando o sustituyendo iones de metales esenciales de biomoléculas y unidades celulares funcionales,
- ✓ desnaturalizando e inactivando enzimas,
- ✓ rompiendo la integridad de membrana de células y orgánulos celulares y
- ✓ promoviendo la generación de especies reactivas que causan estrés oxidativo.

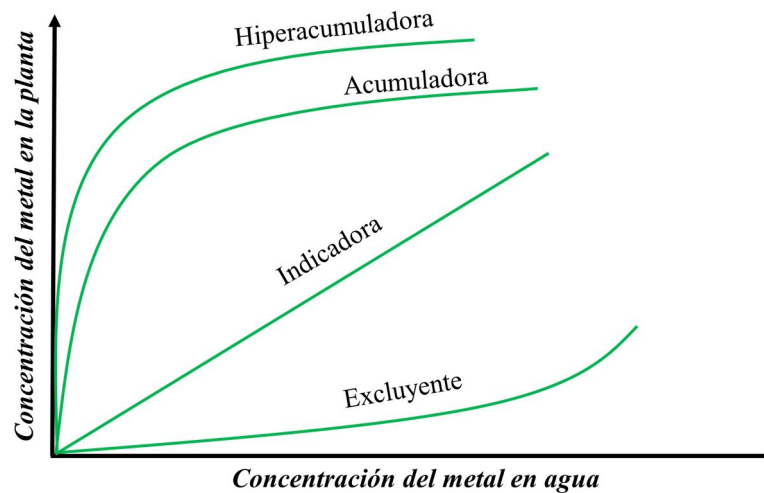
Los mecanismos de defensa de las plantas frente a la fitotoxicidad de los metales pueden tener carácter extracelular o intracelular. Estos procesos de prevención permiten mantener una baja concentración del metal en el simplasto (**Tabla 2**), operando de forma conjunta y coordinada, e incluso

estar apoyados por la presencia de organismos distintos a la propia planta que, como las micorrizas, les confieren resistencia en forma de barrera física impidiendo el acceso de los metales a las células radicales de la planta afectada (Bradley y col., 1981, 1982, Macnair, 1997, Leyval y col., 1997, Cairney y Meharg, 2003, Midgley y col., 2004).

<b>Mecanismos de exclusión o barrera</b>	Secreción de quelantes que disminuyen la solubilidad del metal o reducen la eficacia del transporte al interior de la célula
	Secreción de compuestos que cambian el pH de la rizosfera y afectan la especiación del metal
	Producción de residuos aniónicos en la pared celular, donde quedan atrapados los iones metálicos
<b>Mecanismos defensivos intracelulares de control e inertización</b>	Modificación de las propiedades de la membrana celular, o estructuras proteicas asociadas, reduciendo el transporte del metal hacia el citosol
	Modulación de las vías de transporte (simporte o antiporte), disminuyendo la entrada neta del metal contaminante en la célula.
	Alteración (constitutiva o inducible) de enzimas sensibles para prevenir la inhibición por el metal
	Producción de sustancias quelantes (fitoquelatinas y metalotioneinas) que se unen al metal en el interior de la célula, restándole toxicidad al impedir su interacción con diversas biomoléculas
	Transporte del metal hacia la vacuola, donde se almacena y puede ser objeto de otros mecanismos de detoxificación como su unión a agentes quelantes

**Tabla 2:** Mecanismos de defensa generales de las plantas a nivel extracelular e intracelular (adaptada de Macnair, 1997).

Por consiguiente, y en general, la estrategia de las plantas para prevenir los efectos tóxicos de los metales es impedir que éstos estén libres en el citosol y en los orgánulos celulares (Hall, 2002). Por ello, hay plantas cuya tolerancia se basa en la exclusión de metales, de tal manera que la concentración intracelular de éstos es siempre inferior a la existente en el medio. En sentido contrario, hay grupos de plantas que pueden acumular y aún hiperacumular metales en compartimentos celulares aislados y/o ligados a moléculas quelantes que convierten al metal en inocuo (Baker, 1981). Además se puede incluir en esta clasificación a un grupo de plantas denominadas indicadoras que incorporan y acumulan los metales en función de la concentración que se encuentra disponible en el sustrato (Ross y Kaye, 1994). La relación entre la concentración de metal en el agua y en la planta se muestra en la **Fig. 3**.



**Figura 3:** Respuesta de las plantas frente a la concentración de metales en agua (adaptada de Greger, 2004).

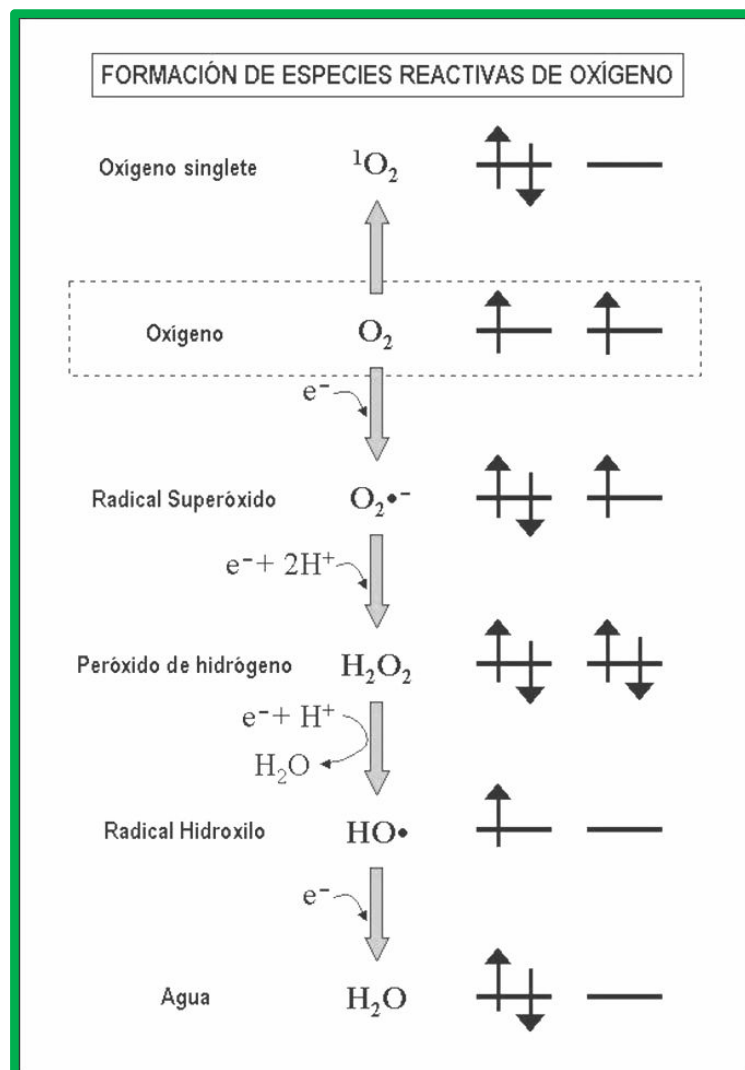
Los mecanismos de defensa de las plantas frente a la acumulación de metales son altamente eficaces para aquellas variedades que se han adaptado a situaciones ambientales específicas, siempre que la concentración de metales se mantenga relativamente estable (Hall, 2002). No obstante, sea por causas naturales o por actividades humanas, si la concentración de los metales aumenta excesivamente o si se incorporan al suelo o agua, metales no esenciales, las barreras defensivas de la planta pueden ser superadas. En estos casos, la planta se verá afectada por los metales, en mayor o menor grado, en función de la especiación del metal y su biodisponibilidad, pudiendo llegar a morir si la contaminación es excesiva. Pero cuando los niveles de metales no superan valores letales y la exposición tiene un carácter crónico, la planta desarrolla una sintomatología ligada al estrés oxidativo derivado de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés – **R**eactive **O**xygen **S**pecies). Un estrés oxidativo persistente provocará una disminución de las capacidades fisiológicas de la planta con síntomas como clorosis, color amarillento, marchitez, atrofia, necrosis, etc. (Macnair, 1997, Prasad, 2004).

### 8.5.1 Estrés oxidativo

La definición biofísica de estrés tiene un significado equivalente al de presión. Por lo tanto, el término estrés en el marco de la fisiología vegetal refleja la magnitud de presión ambiental que obliga al cambio en la fisiología de una planta (Nilsen y Orcutt, 1996).

Desde que la atmósfera fue enriqueciéndose en  $O_2$ , debido principalmente a la proliferación de las cianobacterias fotosintéticas, existió el riesgo de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El  $O_2$  es una molécula relativamente estable que, sin embargo, puede generar especies mucho más reactivas a través de reacciones de transferencia de energía o de electrones. Las ROS son

moléculas con moderada ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , peróxido de hidrógeno;  $\cdot\text{O}_2^-$ , radical superóxido) o elevada ( $\cdot\text{OH}$ , radical hidroxilo;  $^1\text{O}_2$ , oxígeno singlete) reactividad química que se generan durante el metabolismo celular (**Fig. 4**). El radical hidroxilo se origina por reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con cantidades traza de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  (reacciones de Fenton). Este radical hidroxilo es extremadamente oxidante y reacciona instantáneamente con moléculas próximas. Un ejemplo de gran importancia biológica es su capacidad para iniciar la peroxidación de lípidos. En cambio, el radical  $\text{O}_2^-$  o el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no causan daño oxidativo por sí mismos, pero si intervienen en la formación de ROS (Halliwell y Gutteridge, 2007). El  $^1\text{O}_2$  oxida a diferentes biomoléculas en función de su localización intracelular, daña las membranas e incluso interviene en la inducción de la muerte celular (Ryter y Tyrrell, 1998).



**Figura 4:** Esquema de los diferentes estados de oxidación del oxígeno.

Se muestra en la columna de la derecha con una flecha, el spin que presentan los electrones de la última capa de cada uno de los radicales (García, 2009).

En las plantas, las ROS se producen principalmente en la fotosíntesis, respiración, metabolismo celular, respuesta a estrés y fijación de  $\text{N}_2$ . Por lo tanto, las ROS surgen en las células vegetales a través

de varias rutas y la mayoría de los compartimentos celulares tienen el potencial de convertirse en una fuente de ROS (**Tabla 3**), por ejemplo:

✓ **Cloroplastos:** En los cloroplastos el fotosistema I puede reducir el  $O_2$  a radical  $O_2^-$  a través de la reacción de Mehler (fotorreducción de  $O_2$ ) y el fotosistema II puede generar radicales  $O_2^-$  y  $^*OH$ . En el interior de los cloroplastos se puede producir  $^1O_2$  cuyo la clorofila transfiere la energía de excitación al  $O_2$  (Apero y Hirt, 2004; Halliwell y Gutteridge, 2007).

✓ **Mitocondrias:** Durante la respiración mitocondrial se reduce el  $O_2$  a  $H_2O$  a través de la cadena de transporte electrónico. Esta reducción puede tener lugar por un mecanismo tetravalente (citocromo c oxidasa, oxidasa alternativa), pero, inevitablemente, un 1-2% del  $O_2$  consumido genera ROS. Esto ocurre principalmente en los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa) de la membrana interna mitocondrial. La Mn-superóxido dismutasa (MnSOD) mitocondrial actúa sobre el radical  $O_2^-$  transformándolo en  $H_2O_2$ , que puede a su vez ser reducido por iones  $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$  a radicales  $^*OH$  en reacciones tipo Fenton (Navrot y col., 2007). En las mitocondrias se genera también NO que puede interferir con la actividad del complejo III (Yamasaki y col., 2001).

✓ **Peroxisomas:** En los peroxisomas se produce  $H_2O_2$ , entre otros procesos, durante la fotorrespiración mediante la glicolato oxidasa, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y la dismutación del radical  $O_2^-$ . Se ha demostrado también la formación de  $O_2^-$  y NO en los peroxisomas, y se ha propuesto que estas moléculas tienen una función señalizadora. El  $O_2^-$  se origina en la matriz por acción de la xantina oxidasa y en la membrana por un mecanismo dependiente de NAD(P)H (del Río y col., 2006). La capacidad de producir y regular la liberación de ROS y RNS al citosol, así como la proliferación de peroxisomas en respuesta a diversos estreses y durante la senescencia, determinan que estos orgánulos desempeñen un papel clave en la respuesta al estrés oxidativo en las plantas (Corpas y col., 2001; del Río y col., 2002).

MECANISMO DE PRODUCCIÓN	LOCALIZACIÓN
$O_2^-$ en fotosíntesis (transporte de electrones, PSI y PSII)	Cloroplasto
$O_2^-$ en respiración (transporte de electrones)	Mitocondria

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por la glicolato oxidasa	Peroxisoma
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por clorofila excitada	Cloroplasto
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por la NADPH oxidasa	Membrana plasmática
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por la β-oxidación de ácidos grasos	Peroxisoma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por la oxalato oxidasa	Apoplasto
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por la xantina oxidasa	Peroxisoma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por peroxidases, Mn y NADH	Pared celular

**Tabla 3:** Procesos de producción de especies reactivas de oxígeno en plantas. Modificado de Mittler (2002).

Las ROS no son moléculas tóxicas por definición, tienen un papel importante en los procesos de señalización en las plantas y controlan procesos fundamentales, tales como el crecimiento, el desarrollo, la respuesta a estímulos medio-ambientales y la muerte celular programada (Bailey-Serres y Mittler, 2006). En condiciones normales, la producción y remoción de las ROS está estrictamente controlada, a través de una serie de complejos mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (**Tabla 4**). Sin embargo, este equilibrio puede ser perturbado por una serie de factores medio-ambientales adversos, ya sean bióticos o abióticos, produciendo lo que se conoce como estrés oxidativo.

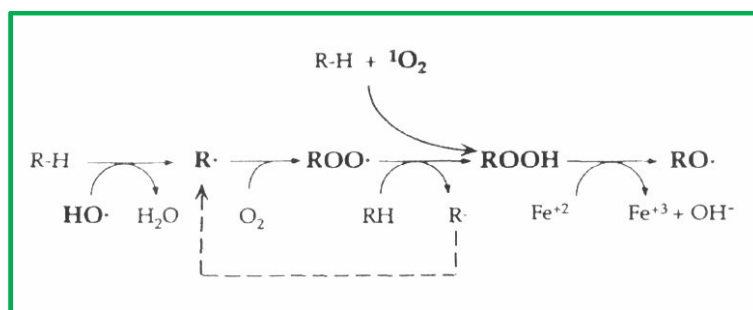
ELIMINACIÓN	LOCALIZACIÓN
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> por superóxido dismutasa	Cloroplasto, mitocondria, citoplasma, peroxisoma, apoplasto
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por la ascorbato peroxidasa	Cloroplasto, mitocondria, citoplasma, peroxisoma, apoplasto
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por la catalasa	Peroxisoma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y OH <sup>-</sup> por la glutatión peroxidasa	Citoplasma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por peroxidases	Pared celular, citoplasma, vacuola
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por tioredoxina peroxidasa	Cloroplasto, citoplasma, mitocondria

$H_2O_2$ y $O_2^-$ por ácido ascórbico	Cloroplasto, citoplasma, mitocondria, peroxisoma, apoplasto
$H_2O_2$ por el glutatión	Cloroplasto, citoplasma, mitocondria, peroxisoma, apoplasto
$OH^-$ y $O_2^-$ por el $\alpha$ -tocoferol	Membranas
$O_2^-$ por carotenoides	Cloroplasto

**Tabla 4:** Procesos de eliminación de especies reactivas de oxígeno en plantas. Modificado de Mittler (2002).

El “estrés oxidativo” es una expresión que se refiere al establecimiento de un desbalance entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes presentes en mayor o menor medida en todos los tejidos. Fue Sies quien introdujo el término como título del libro que editó en 1985 “*Oxidative stress*”. En su segunda edición en 1991 lo define como “*una alteración en el balance prooxidante-antioxidante en favor del primero, llevando a un daño potencial*”. A este daño se lo llama “daño oxidativo”, el cual puede dividirse en tres tipos:

➤ *Daño a lípidos:* el daño a lípidos causados por las ROS, conducen a la peroxidación lipídica y se producen como resultado una cadena de reacciones que implica a los ácidos grasos poliinsaturados (**Fig. 5**), y que da lugar a la desestabilización de las membranas celulares, pudiendo causar la muerte de la célula al afectar a una variedad de procesos de transporte, reconocimiento celular, señalización celular, etc. Uno de los productos finales de esta cadena de reacciones es el malondialdehído (MDA), compuesto que se forma por la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en las células. Su concentración intracelular puede medirse fácilmente, siendo indicativa del grado de estrés oxidativo que padecen las células (Hodges y col., 1999).



**Figura 5:** Esquema del proceso de peroxidación lipídica.



➤ *Daño a proteínas:* Las proteínas también pueden ser atacadas por las ROS, siendo el radical hidroxilo la molécula que inicia las reacciones de oxidación. La oxidación de los aminoácidos (especialmente histidina, cisteína, tirosina y triptófano) afecta a las estructuras primaria, secundaria y terciaria de la proteína, provocando uniones internas entre cadenas peptídicas o roturas de las mismas, con la consiguiente pérdida de su actividad funcional, sea catalítica o estructural (Berlett y Stadman. 1997, Foyer y Noctor 2005).

➤ *Daño al ADN:* El radical hidroxilo puede alcanzar al ADN genómico o mitocondrial, con el que reacciona oxidándolo mediante la captación de protones de las bases nitrogenadas. Una vez que se oxidan estas bases, se pueden producir una variedad de alteraciones de carácter mutagénico por pérdida o deleción de fragmentos de ADN, formación de enlaces cruzados ADN/ADN, ADN/proteínas, etc. (Briat y Lebrun 1999, Briat, 2002). Además de estos daños que afectan directamente al ADN, la alteración por oxidación de una variedad de proteínas que catalizan las diversas fases de la expresión génica, dará lugar a daños epigenéticos que interferirán con numerosos procesos celulares.

La consecuencia final de un estrés oxidativo prolongado será la muerte celular y, en el peor de los casos, la muerte de la planta (Briat, 2002).

Una vez definido el estrés oxidativo, se van a definir los principales mecanismos de defensa con los que cuentan las plantas, poniendo más énfasis en aquellos evaluados en esta tesis.

### **8.5.2 Defensa de las plantas ante el estrés oxidativo**

Las plantas, como todos los seres vivos, han desarrollado una variedad de mecanismos para defenderse del estrés oxidativo producido por aumento de las ROS. Estos mecanismos incluyen tanto sistemas enzimáticos como no enzimáticos que previenen la formación de ROS o impiden la propagación de las reacciones de oxidación, originadas por éstas, mediante la reducción de intermediarios oxidados (Clijsters y col., 1999).

En general, los mecanismos de defensa de las plantas se basan en 3 tipos:

1) La presencia de agentes reductores: interactúan directamente con las especies oxidadas (sean ROS o compuestos orgánicos), siendo los más importantes el ácido ascórbico y el glutatión, aunque existen otras muchas moléculas reductoras que actúan como antioxidantes (vitaminas lipofílicas como tocoferol o coenzima Q; compuestos volátiles como terpenos, arenas y ésteres; polifenoles, antocianinas, flavonoides, carotenos; ácidos grasos poliinsaturados, etc.) (Blokhina y col., 2003).

2) El mantenimiento de un estado redox adecuado en la célula: esto se logra vía la generación de piridín-nucleótidos reducidos originados por oxidación de compuestos orgánicos en reacciones catalizadas por la enzima málica, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa o la glutamato deshidrogenasa (Clijsters y col., 1999).

3) La actividad de sistemas enzimáticos: que catalizan la eliminación de ROS o la reducción de radicales de moléculas orgánicas, como las superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas (Clijsters y col., 1999).

#### 8.5.2.1 Sistema de defensa enzimática en las plantas

Una posible clasificación de los sistemas enzimáticos que presentan las células vegetales se muestra a continuación:

ENZIMAS QUE METABOLIZAN ROS	PEROXIDASAS (POD) SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) CATALASA (CAT)
ENZIMAS DEL CICLO ASCORBATO-GLUTATION	ASCORBATO PEROXIDASA (APX) MONODEHIDROASCORBATO REDUCTASA (MDHR) DEHIDROASCORBATO REDUCTASA (DHR) GLUTATIÓN REDUCTASA (GR) ENZIMA MÁLICA (ME)
ENZIMAS REDUCTORAS DE NAD(P) <sup>+</sup>	GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH) ISOCITRATO DESHIDROGENASA (ICDH) GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH)

**Tabla 5:** Clasificación de los sistemas enzimáticos (Clijsters y col., 1999).

➤ **Catalasa (CAT):** La enzima catalasa (EC 1.11.1.6) es una hemoproteína tetramérica (220kD), tiene como sustrato el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Inzé y Van Montagu, 1995, Mittler, 2002, Van Breusegem y col., 2001). Tiene una alta capacidad de reacción, pero muy poca afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Willekens y col., 1997, Smirnoff, 1998). Esta baja afinidad por el sustrato hace pensar que su papel principal es la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cuando este está a elevadas concentraciones bajo condiciones de estrés (Mittler, 2002, Smirnoff, 1998). A diferencia de otras peroxidasas, la catalasa no requiere de un sustrato reductor para poder actuar (Inzé y Montagu, 1995). Se localiza en los peroxisomas, glioxisomas y mitocondrias (Inzé y Montagu, 1995, Mittler, 2002, Van Breusegem y col., 2001). Los peroxisomas son orgánulos con diversas funciones en las células de las plantas y hongos, como la fotorrespiración, la oxidación de los lípidos, el ciclo del glicoxilato y el metabolismo de las especies reactivas del oxígeno entre otras. Por ello el importante papel que tiene la catalasa en la eliminación de ROS en estos orgánulos (del Rio y col., 2002). Se han descrito tres variedades de esta enzima que pueden presentarse o no en todas las plantas (difieren según las especies), con diferentes funciones. La

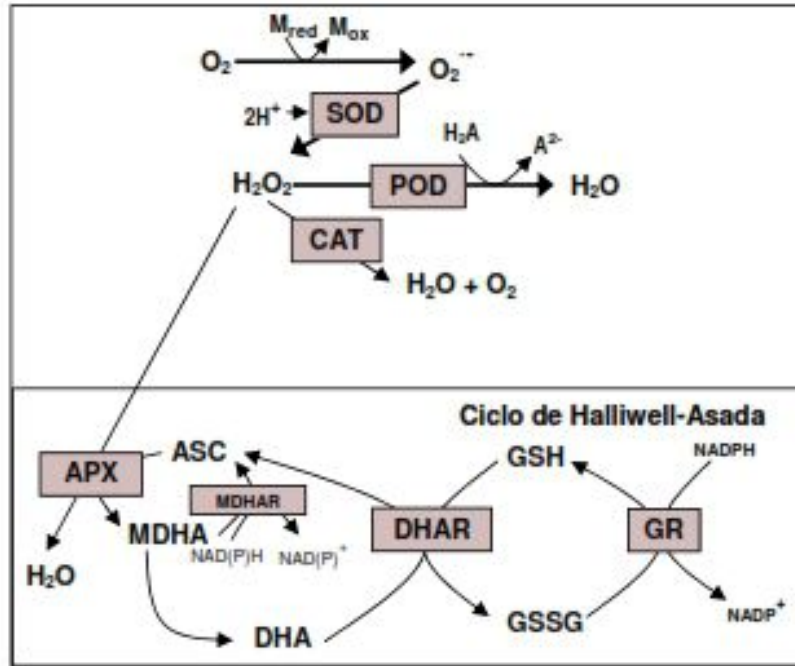
*cat1*, encargada de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido en la fotorrespiración, la *cat2* tiene la función de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se forma durante el estrés oxidativo y la *cat3* que elimina el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado durante la oxidación de los ácidos grasos (Inzé y Montagu, 1995).

➤ ***Superóxido dismutasa (SOD)***: La enzima superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) está presente en casi todos los organismos aerobios. Es una de las enzimas clave en los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo (Van Breusegem y col., 2002) ya que actúa sobre los radicales superóxido (del Rio y col., 2002, Scandalios, 1993). Esta enzima hace que la reacción sea 10000 veces más rápida que la dismutación espontánea (Bowler y col., 1992) y requiere de la presencia de un cofactor metálico (Inzé y Montagu, 1995). Se clasifica según el cofactor sea cobre o zinc, hierro y manganeso (Cu/ZnSOD, FeSOD y MnSOD, respectivamente). Normalmente, la MnSOD se localiza en las mitocondrias de todas las células eucariotas, mientras que las Cu/ZnSOD se han encontrado en el citosol, peroxisomas y cloroplastos de las plantas superiores (Van Breusegem y col., 2002).

➤ ***Guaiacol peroxidasa (POD)***: Se denomina guaiacol peroxidasa (EC 1.11.1.7) a un conjunto de enzimas presentes en el citosol, la vacuola y la pared celular en las células vegetales que, al igual que la catalasa y la ascorbato peroxidasa, tienen como sustrato al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al cual reducen hasta agua (Mehlhorn y col., 1996). Tanto esta enzima como la ascorbato peroxidasa son inducidas por la presencia de metales pesados (Clijsters y col., 1999).

➤ ***Glutación reductasa (GR)***: La glutatión reductasa (EC 1.6.4.2) es una enzima que actúa reduciendo el glutatión disulfuro (GSSG) a glutatión (GSH) y necesita de la presencia de NADPH como agente reductor. Tiene un importante papel en la regeneración del glutatión, y es también parte del ciclo de Halliwell-Asada. En este ciclo, el glutatión se oxida para regenerar el ascorbato. Es la última enzima implicada en el ciclo de Halliwell-Asada, además de jugar un importante papel en numerosos procesos celulares (Inzé y Montagu, 1995). Esta enzima se localiza en las plantas superiores en los plástidos y en el citosol (Mullineaux y Creissen, 1997).

A modo de representación esquemática, en la siguiente figura (**Fig. 6**) se muestra un esquema general de algunas de las enzimas implicadas en la defensa frente a las ROS.



**Figura 6:** Esquema de algunas de las enzimas implicadas en la defensa frente a las ROS.

SOD superóxido dismutasa; POD peroxidasas; CAT catalasa; APX ascorbato peroxidasa; MDHAR monodehidroascorbato reductasa; DHAR dehidroascorbato reductasa; GR glutatión reductasa; ASC ascorbato reducido; MDHA monodehidroascorbato; DHA dehidroascorbato; GSH glutatión reducido; GSSG glutatión oxidado.

## 8.6 Antecedentes sobre efectos fisiológicos y bioquímicos en *E. crassipes* expuesta a metales pesados.

Se han observado efectos en parámetros fisiológicos (concentración de clorofilas, proteínas, fósforo inorgánico, peso seco, permeabilidad, etc.) en *E. crassipes* cuando se la expuso a Hg (Jana y col., 1987), Cr (VI) (Jana y col., 1987, Satyakala y Kaiser, 1997, Mishra y col., 2009), Cd (Mishra y col., 2007) y Cu (Hu y col., 2007), para diferentes tiempos de exposición (de 24 hs a 28 días) y concentraciones de metal. En cuanto a alteraciones morfológicas (como clorosis, amarillamiento, etc.) también han sido observadas en exposiciones a Cr (VI) (Satyakala y Kaiser, 1997).

Por otra parte, se ha demostrado que exposiciones a metales pesados tales como Hg (Jana y col., 1987, Odjegba y Fasidi, 2007, Narang y col., 2008), Cr (VI) (Jana y col., 1987, Satyakala y Kaiser, 1997, Mishra y col., 2009), Cu (Alves y col., 2003, Odjegba y Fasidi, 2007), Cd (Sanità de Troppi y col., 2007, Vestena y col., 2011), Ni, Zn y Pb (Odjegba y Fasidi, 2007) producen estrés oxidativo, en esta especie de macrófita, observado en los efectos a nivel bioquímico (actividades de catalasas, proteasas, peroxidasas y fosfatasa ácida-alcalina). En algunos de estos estudios también se ha detectado el incremento de la concentración de malondialdehído, lo cual es un indicio de la presencia de peroxidación lipídica (Hu y col., 2007, Narang y col., 2008).

Algunos estudios profundizaron sobre la exposición a metales pesados en combinación con nutrientes, tales como nitrógeno (N) y fósforo (P). Como por ejemplo el realizado por Alves y col. (2003), los cuales concluyeron que la exposición a Cu con suplementación de nutrientes produce cambios positivos a nivel fisiológico. Otro ejemplo de estudio de respuestas fisiológicas a la exposición combinada de Hg y exceso de nutriente, fue realizado por Caldelas y col. (2009). Luego de 8 semanas, la acumulación de P y S fue reducida por la presencia de HgCl<sub>2</sub>. En contraste, la adición de HgCl<sub>2</sub> incrementó las concentraciones de Ca y Mg en las partes sumergidas (raíces). La interacción de la exposición combinada fue sinérgica, disminuyendo la concentración de clorofila, P y Mn en las partes emergentes (parte aérea). Mientras que la interacción produjo un incremento de la concentración de Ca y K en la parte sumergida.

De acuerdo a los trabajos citados, se observan cambios significativos en los parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo en plantas de *E. crassipes*, los cuales constituirían mecanismos para establecer la homeostasis en su interior, tolerando así la presencia de metales pesados. Finalmente, cabe aclarar que es necesario investigar más sobre estas respuestas para obtener una mejor comprensión de los efectos que provoca la exposición a metales pesados. Así también, en los wetlands construidos, donde es utilizada esta macrófita, la presencia de mezclas de metales pesados y de nutrientes (provenientes de efluentes cloacales) es muy común, para lo cual sería indispensable la investigación adicional de los efectos de estos contaminantes en forma conjunta. Es de destacar, que la mayoría de los estudios llevados a cabo en laboratorio, utilizan un medio de cultivo enriquecido, tal como la solución de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950), lo cual, si bien favorece el crecimiento de las plantas, no sería representativo de las condiciones de crecimiento en un ambiente natural.

En esta tesis se investigará los efectos sobre la *Eichhornia crassipes* ante la exposición a diferentes concentraciones de metales pesados (Cr (III), Ni (II) y Zn (II)), tanto en forma aislada como combinada y la influencia de la presencia de nutrientes. Este trabajo será útil para entender como las plantas son capaces de ajustar las estrategias de desintoxicación enzimática con el fin de prevenir el estrés oxidativo inducido por la exposición a metales.

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

## 9 OBJETIVOS

### 9.1 Objetivo General

Evaluar si los metales pesados (Cr (III), Ni (II) y Zn (II)) provocan modificaciones sobre parámetros fisiológicos (pigmentos fotosintéticos) y de estrés oxidativo (enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica) en la macrófita *Eichhornia crassipes*, tanto en su parte aérea como en la raíz.

### 9.2 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la tolerancia y la capacidad de sorción de Cr (III), Ni (II) y Zn (II), en forma aislada y combinada, de *E. crassipes*.
- ✓ Determinar si existen cambios en las concentraciones de clorofilas y carotenoides de la *E. crassipes*, en presencia de metales pesados.
- ✓ Determinar si existen cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes en *E. crassipes*, sometida a estrés abiótico por presencia de metales pesados.
- ✓ Determinar el daño oxidativo en lípidos, a nivel de membrana celular, por la presencia de metales pesados.
- ✓ Evaluar cómo influye la presencia de nutrientes en la capacidad de sorción de metales en forma aislada y combinada.
- ✓ Evaluar la influencia de la presencia de nutrientes en la respuesta a nivel fisiológico y de estrés oxidativo de la macrófita *E. crassipes* cuando ésta es expuesta a metales pesados, en forma aislada y combinada.
- ✓ Evaluar si la combinación de metales, en presencia y ausencia de nutrientes, influyen sobre la sorción de cada metal y los cambios en los parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo que estos producen en *E. crassipes*.

## 10 HIPÓTESIS

- ✓ *E. crassipes* será tolerante a la presencia de Cr (III), Ni (II) y Zn (II).
- ✓ La presencia de metales pesados, en forma aislada y combinada, producirá una modificación sobre la concentración de clorofilas, carotenoides y del sistema de defensa enzimático antioxidante en *E. crassipes*.
  - ✓ El estrés oxidativo, inducido por la presencia de metales pesados, producirá daño a nivel de membrana celular, ocasionando peroxidación lipídica.
  - ✓ La presencia de nutrientes favorecerá la tolerancia y disminuirá la sorción de metales pesados por parte de las plantas.
  - ✓ La combinación de metales y la presencia de nutrientes, afectarán la sorción de metales y modificará los efectos sobre los parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

# 11 MATERIALES Y MÉTODOS

## 11.1 Diseño Experimental

La especie vegetal seleccionada fue la macrófita flotante *Eichhornia crassipes*. Es una especie que puede crecer muy rápidamente (Tchobanoglous y Burton, 1996) y adaptada a las condiciones climáticas de la zona. Además presentó buenos resultados de acumulación y tolerancia de metales pesados en experiencias previas, realizadas por el grupo de investigación (Maine y col., 1998, 2001, Hadad y Maine, 2001, Hadad y col., 2007, 2011).

Antes de cada experiencia se realizaron campañas para la búsqueda y colecta de muestras de *Eichhornia crassipes*, en brazos del río Paraná, en sitios no contaminados por descargas de efluentes industriales o cloacales en las cercanías (**Fig. 7**).



**Figura 7:** Foto satelital del lugar de campaña (extraída de Google Earth).

Luego, las plantas recolectadas fueron aclimatadas en el laboratorio bajo condiciones controladas en una cámara de cultivo, realizada especialmente para esta investigación. Las condiciones fueron las siguientes: luz ( $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de densidad de flujo de fotones fotosintéticos), temperatura ( $24 \pm 3$  °C) y humedad ( $50 \pm 10$  %). La luz proviene de una mezcla de fluorescentes Sylvania GroLux (espectro rojo y azul) y fluorescentes comunes. La cámara de cultivo se observa en la **Fig. 8**.



**Figura 8:** Fotografías de la cámara de cultivo.

Después de 7 días de aclimatación, se seleccionaron plantas sanas y jóvenes, de un tamaño uniforme y un peso similar para los fines experimentales.

















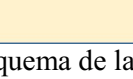
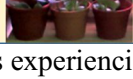


Dos litros de agua de red de clorada y una planta (30 a 40 g de biomasa de planta fresca), fueron dispuestos en cada una de los reactores plásticos experimentales. El agua de red se utilizó para simular las condiciones del sistema acuático natural. La composición fisicoquímica del agua utilizada en los experimentos fue la siguiente:

PARÁMETROS	VALORES ( $\bar{X} \pm DE$ )
Conductividad	134 $\pm$ 2 ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
pH	7,1 $\pm$ 0,1
Oxígeno disuelto (DO)	7.6 $\pm$ 0.10 ( $\text{mg l}^{-1}$ )
Fósforo reactivo soluble (PRS)	0.035 $\pm$ 0.002 ( $\text{mg l}^{-1}$ )
Amonio ( $\text{NH}_4^+$ )	0.550 $\pm$ 0.019 ( $\text{mg l}^{-1}$ )
Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )	0.651 $\pm$ 0.005 ( $\text{mg l}^{-1}$ )
Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )	0.008 $\pm$ 0.001 ( $\text{mg l}^{-1}$ )
Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )	10.3 $\pm$ 0.8 ( $\text{mg l}^{-1}$ )

Magnesio ( $Mg^{2+}$ )	$3.8 \pm 0.5$ ( $mg\ l^{-1}$ )
Sodio ( $Na^+$ )	$13.7 \pm 1.0$ ( $mg\ l^{-1}$ )
Potasio ( $K^+$ )	$3.50 \pm 0.5$ ( $mg\ l^{-1}$ )
Cloruro ( $Cl^-$ )	$10.6 \pm 1.3$ ( $mg\ l^{-1}$ )
Sulfato ( $SO_4^{2-}$ )	$8.0 \pm 1.8$ ( $mg\ l^{-1}$ )
Bicarbonato ( $HCO_3^-$ )	$51.7 \pm 0.8$ ( $mg\ l^{-1}$ )
Hierro Total (Fe)	$5$ ( $\mu g\ l^{-1}$ )
Cromo total (Cr)	ND (LD = $2\ \mu g\ l^{-1}$ )
Níquel (Ni)	ND (LD = $2\ \mu g\ l^{-1}$ )
Zinc (Zn)	ND (LD = $5\ \mu g\ l^{-1}$ )









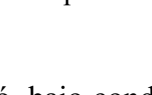
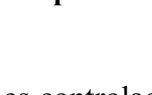
**Tabla 6:** Caracterización fisicoquímica del agua utilizada en los experimentos, (ND = no detectado, LD = límite de detección).

En el **Capítulo I**, se describen las experiencias llevadas a cabo a corto plazo, en cámara de cultivo, bajo condiciones controladas, para evaluar la sorción y el efecto sobre parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo, de los metales pesados Cr (III), Ni (II) y Zn (II) (en forma aislada) a diferentes concentraciones, entre ellas las concentraciones de metales usuales encontradas en los efluentes de los wetlands construidos. Esquema de las experiencias (**Fig. 9**):

Concentración del metal ( $mg\ l^{-1}$ )			Tiempo de exposición			
			0 hs	24 hs	48 hs	72 hs
Control						
0						
Exp. 1 Cr (III)	Exp. 2 Ni (II)	Exp. 3 Zn (II)				
2	1	2				
4	2	4				
6	3	6				
8	4	9				

**Figura 9:** Esquema de las experiencias del **Capítulo I**.

En el **Capítulo II**, se describen las experiencias llevadas a cabo en cámara de cultivo, bajo condiciones controladas, para evaluar la sorción y el efecto sobre parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo de soluciones con Cr (III), Ni (II) y Zn (II) (en forma aislada) en combinación con nutrientes (P y N) a fin de simular las condiciones del tratamiento de un efluente cloacal y un industrial en forma conjunta como se hace en los wetlands bajo estudio. Las experiencias tuvieron una duración de 5 días. Esquema de las experiencias (**Fig. 10**):

Concentración del metal (mg l <sup>-1</sup> )			Nutrientes (5 mg l <sup>-1</sup> de P + 15 mg l <sup>-1</sup> de N )	
Control			Con	Sin
0				
Exp. 1 Cr (III)	Exp. 2 Ni (II)	Exp. 3 Zn (II)		
4	2	4		
6	3	6		
8	4	9		

**Figura 10:** Esquema de las experiencias del **Capítulo II**.

Por último, en el **Capítulo III**, se evaluó, bajo condiciones controladas, la sorción y el efecto sobre parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo de soluciones combinadas de Cr (II), Ni (II) y Zn (II) sobre *E. crassipes*, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes (P y N) (**Fig. 11**). Las experiencias tuvieron una duración de 5 días.

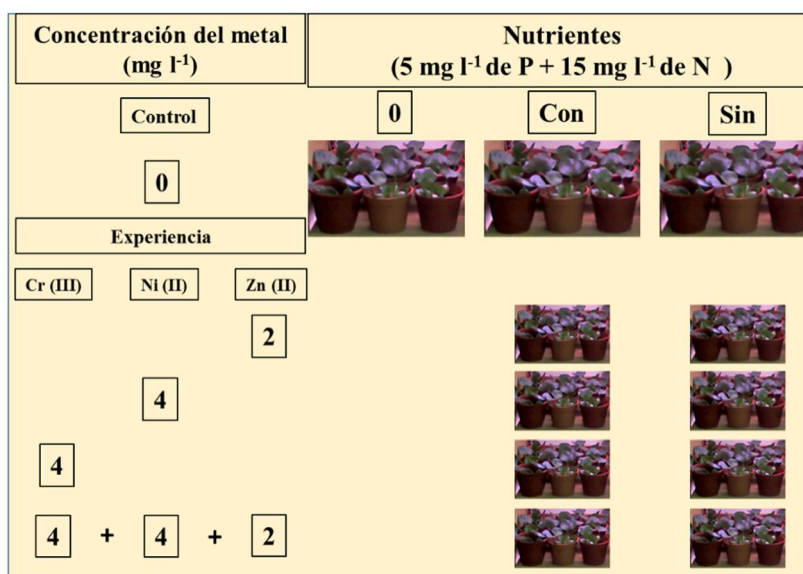


Figura 11: Esquema de las experiencias del **Capítulo III**.

Para las diferentes determinaciones llevadas a cabo en las experiencias, las plantas fueron diseccionadas en dos partes, la aérea (consta de hoja y pecíolo) y la raíz. Al comienzo y final de las experiencias en laboratorio, se determinó las concentraciones de metales en tejidos y las concentraciones de clorofilas y carotenoides, así como también el nivel de peroxidación lipídica. También se determinaron las actividades de enzimas involucradas en el sistema de defensa antioxidante como: catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), guaiacol peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7) y la glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2). Dichas determinaciones se describen a continuación:

## 11.2 Determinaciones analíticas

### 11.2.1 Determinaciones 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.



- **Amonio ( $NH_4^+$ ):** nesslerización directa, previa precipitación de interferencia utilizando tartrato de sodio y potasio. El color amarillo desarrollado se mide a 425 nm con un espectrofotómetro.
- **Nitrato ( $NO_3^-$ ):** medición potenciométrica con electrodo selectivo (Potenciómetro y Electrodo Orion, sensibilidad 0,01 mg l<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, reproducibilidad ± 2%), utilizando método de adición estándar.
- **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 hidrócloruro, obteniéndose un compuesto rosado que se lee con un espectrofotómetro a 543 nm.
- **Calcio ( $Ca^{2+}$ ):** volumetría quelatométrica con EDTA trabajando a pH=12 (llevado con NaOH) y utilizando murexida como indicador.
- **Magnesio ( $Mg^{2+}$ ):** 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.
- **Cloruro ( $Cl^-$ ):** titulometría por precipitación con nitrato de plata (Método de Mohr), utilizando dicromato de potasio como indicador.
- **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.
- **Carbonato-Bicarbonato ( $HCO_3^-$ ):** por volumetría ácido-base con hidróxido de sodio, usando fenolftaleína y verde de bromo cresol como indicadores.
- **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 AAnalyst 200, siguiendo los métodos propuestos por APHA (1998).

### 11.2.2 Determinación de metales en tejidos de plantas

Los vegetales se separaron en parte aérea (hoja-tallo) y raíces y se secaron en estufa a 70 °C hasta peso constante, se sometieron a digestión con HCl:HNO<sub>3</sub> (10:4) (Método USEPA 200.2, 1994). Luego, las concentraciones de Cr, Ni y Zn se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica con

llama (Perkin Elmer AAnalyst 200). Se utilizaron soluciones estándar certificadas. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Las concentraciones se refirieron a peso seco.

El factor de translocación (FT) se calculó como la relación entre la concentración del metal en las partes aéreas y las raíces.

### **11.2.3 Determinación de pigmentos fotosintéticos**

Se tomaron hojas frescas por cada tratamiento y se usaron para estimar los pigmentos fotosintéticos. Las concentraciones de clorofila y carotenoides se estimaron de acuerdo con el procedimiento de Arnon (1949). Los pigmentos fotosintéticos se extrajeron de hojas frescas (0,5 g, aproximadamente) utilizando 80% acetona fría, durante 48 h en la oscuridad a 3-5 ° C sin agitación y con la adición de un pizca de carbonato de magnesio, para proteger y estabilizar los pigmentos. Los extractos se filtraron y se midieron por espectrofotometría a 663, 646 y 470 nm. Las concentraciones de pigmentos ( $\text{mg g}^{-1}$  PF) se calcularon de acuerdo a las ecuaciones de Wellburn (1994).

#### **Ecuaciones utilizadas (Wellburn, 1994) ( $\mu\text{g/ml}$ )**

$$\text{Clorofila } a = 12,21 A_{663} - 2,81 A_{646}$$

$$\text{Clorofila } b = 20,13 A_{646} - 5,03 A_{663}$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 A_{470} - 3,27 C_a - 104 C_b) / 198$$

### **11.2.4 Determinación de enzimas antioxidantes**

Durante las experiencias se extrajo parte aérea (hojas-pecíolo) y raíz (0.5-1 g PF, aproximadamente) para la extracción enzimática de acuerdo a Pflugmacher y Steinberg (1997), con modificaciones menores. Brevemente, los tejidos fueron colocados en un mortero y macerados hasta polvo fino, en presencia de nitrógeno líquido. Los extractos enzimáticos se prepararon a partir de plantas individuales (no pooles), llevándose a cabo a 4° C. Después de ser molido con nitrógeno líquido, el material vegetal se homogenizó en tampón fosfato 0,1 M (pH 6,5), que contiene 20 % v(v) de glicerol, 1,4 mM de dithioerythritol (DTE) y 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), en una relación 2:1 (v/p). Por último, los homogenatos se centrifugaron a 12000 g durante 15 min a 4° C. El sobrenadante resultante, correspondiente a la fracción soluble, fue utilizado como extracto enzimático, almacenándose en alícuotas separadas a -80° C. Para las mediciones de actividad



enzimática todas las operaciones se realizaron a 4°C, manteniendo las muestras en un baño de hielo hasta que los ensayos se completaran.

Las mediciones enzimáticas de cada muestra se llevaron a cabo por triplicado y fueron calculadas según el contenido proteico (Bradford, 1976).

#### *11.2.4.1 Determinación de catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)*

La enzima CAT cataliza la destrucción del peróxido de hidrógeno formando agua y oxígeno. Su cuantificación se determinó según el método propuesto por Aebi (1984) basado en la disminución de absorbancia, debida a la desaparición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se produce a 240 nm y 30°C. La actividad enzimática de CAT se expresó como:  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$

#### *11.2.4.2 Determinación de superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)*

La actividad SOD cataliza la dismutación de superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno. La medición de la actividad de la SOD se realizó según la metodología de Giannopolitis y Ries (1977) y Beyer y Fridovich (1987), mediante un ensayo basado en la inhibición de la reducción fotoquímica del NBT (nitroblue tetrazolium). La actividad enzimática de SOD se expresó como:  $\text{U min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$

#### *11.2.4.3 Determinación de guaiacol peroxidasa (POD) (EC 1.11.1.7)*

La actividad POD elimina el peróxido de hidrógeno utilizando guaiacol como donador de electrones, que es transformado en tetraguaiacol. Para su determinación se usó el método descrito por Bergmeyer (1983). La actividad enzimática de POD se expresó como:  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$

#### *11.2.4.4 Determinación de glutatión reductasa (GR) (EC 1.6.4.2)*

La actividad GR regenera el glutatión reducido a partir de su forma oxidada, utilizando el NADPH como poder reductor, pudiéndose medir la disminución de absorbancia a 340 nm. El ensayo se realizó de acuerdo a lo descrito por Edwards y col. (1990). La actividad enzimática de GR se expresó como:  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$

### ***11.2.5 Determinación de peroxidación lipídica***

El malonaldehído (MDA) es un aldehído citotóxico que se genera en pequeñas cantidades durante la peroxidación de lípidos (lipoperoxidación) (Aruoma y col., 1989). El contenido de MDA se determinó según el método descrito por Heath y Packer (1968). Este método se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con el grupo aldehído del MDA, formando un producto cromóforo rosado con un máximo de absorción a 532 nm. Puesto que algunos aminoácidos y otros compuestos como el ascorbato también reaccionan con el TBA formando aductos que absorben en la zona cercana a 532 nm, se propuso calcular siguiendo la ecuación propuesta por Hodges y col. (1999).

$$1) \quad [(Abs532_{+TBA}) - (Abs600_{+TBA}) - (Abs532_{-TBA} - Abs600_{-TBA})] = A$$

$$2) \quad [(Abs440_{+TBA} - Abs600_{+TBA}) 0,0571] = B$$

$$3) \quad \text{Equivalentes de MDA (nmol ml}^{-1}\text{)} = (A - B/ 157000) 10^6$$

La concentración de MDA se expresó como: **nmol g<sup>-1</sup> PF (peso fresco)**.

### 11.3 Tratamiento estadístico de los resultados

Para el procesamiento de los datos se utilizó el software SPSS Statistics v20.

En todos los casos, a priori, la normalidad de los residuos se estudió gráficamente (gráficos P-P y Q-Q) y mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Se utilizó el test de Levene para comprobar la homocedasticidad (corroborar si las variancias fueron homogéneas). Las comparaciones entre tratamientos fueron analizadas por ANOVA con el test post-hoc de Duncan, para diferenciar medias cuando se detectaron diferencias significativas. Todas las comparaciones tuvieron un nivel de significación de 0,05.

En el Capítulo I, se desarrollan las experiencias para evaluar si las diferentes concentraciones de metales (en forma aislada), en un período de 72 hs con muestreo cada 24 hs, producen alteración sobre los parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo en *E. crassipes*. Se realizó un ANOVA de dos vías, para comparar el efecto del tiempo y las concentraciones de los metales sobre los parámetros evaluados. En el Capítulo II, se desarrollan las experiencias para evaluar si la presencia de nutrientes influye sobre la sorción de metales y los cambios en los parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo que estos últimos producen en *E. crassipes*. Se realizó el test estadístico ANOVA de una vía, para determinar si existieron diferencias significativas en los parámetros medidos entre los diferentes tratamientos (con y sin nutrientes). En el Capítulo III, se desarrollaron las experiencias para evaluar si la combinación de metales y la presencia de nutrientes, influyen sobre la sorción de cada metal y los cambios en los parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo que estos producen en *E. crassipes*. Se realizó el test estadístico ANOVA de una vía, para determinar si existieron diferencias significativas en los parámetros medidos entre los diferentes tratamientos.

## **CAPÍTULO I**

**Acumulación de Cr (III), Ni (II) y Zn (II) (en forma aislada) y  
sus efectos sobre *Eichhornia crassipes***

## 12 CAPÍTULO I

### Acumulación de Cr (III), Ni (II) y Zn (II) (en forma aislada) y sus efectos sobre *Eichhornia crassipes*

#### 12.1 Experiencia N° 1: Acumulación de Cr (III) y sus efectos sobre *Eichhornia crassipes*

##### 12.1.1 Introducción

El cromo no se considera un elemento esencial para la nutrición de las plantas (Shanker y col., 2004, Mangabeira y col., 2011). Sin embargo, el Cr (III) y Cr (VI) pueden ser absorbidos por las plantas utilizando diferentes mecanismos de captación para cada especie de metal. La absorción del Cr (III) es de manera pasiva, ocurriendo por difusión simple, mientras que para el Cr (VI) la absorción es activa (Shewry y Peterson, 1974, Skeffington y col., 1976). En ambientes acuáticos, el Cr (III) es la forma predominante, ya que la reducción de Cr (VI) a Cr (III) se produce en presencia de materia orgánica, de Fe (II) u otros agentes redox (Losi y col., 1994, Fendorf, 1995).

Por encima de las concentraciones umbral, el Cr (III) puede causar efectos tóxicos debido a su capacidad para combinarse con diversos compuestos orgánicos resultando en la inhibición de algunos sistemas de metaloenzima (Shanker y col., 2004). Se ha demostrado que el Cr (III) estimula la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como los radicales superóxido ( $^*O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales hidroxilo ( $^*OH$ ), ya sea por transferencia directa de electrones involucrando cationes metálicos o como consecuencia de la inhibición de reacciones metabólicas (Stohs y Bagchi, 1995).

##### 12.1.2 Metodología

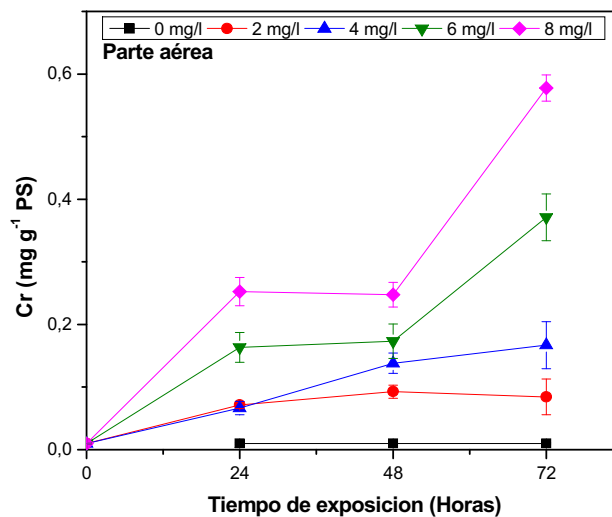
Las plantas recolectadas fueron aclimatadas en el laboratorio bajo condiciones controladas, explicadas en la sección de Metodología. Dos litros de agua de red y una planta (30 a 40 g de biomasa de planta fresca) fueron dispuestos en reactores experimentales de plástico. Una solución de Cr (III) (preparada usando  $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ , marca Merck) fue agregada para obtener concentraciones de 2, 4, 6 y 8 mg l<sup>-1</sup> finales. El pH del agua se mantuvo entre 5,0 y 5,3 (se usó HCl ó Na (OH)) para evitar la precipitación del metal. La duración de la exposición fue de 3 días, tomándose muestras cada 24 hs.

### 12.1.3 Resultados

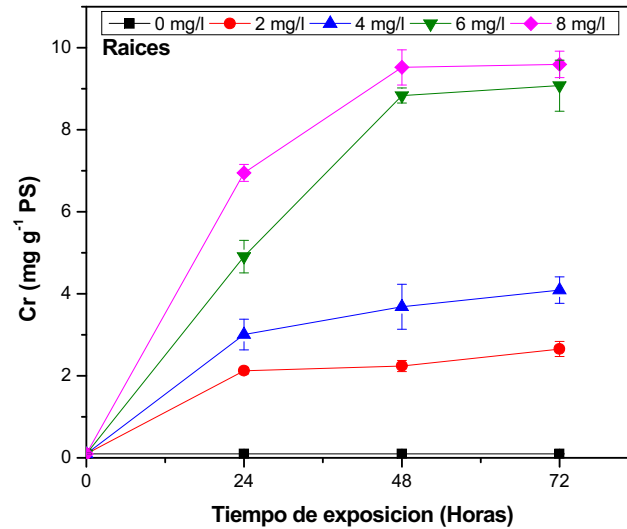
#### Acumulación de Cr y translocación

Se observó un aumento en la concentración de Cr en partes aéreas y raíces con el aumento de la concentración de Cr en la solución y los tiempos de exposición (**Fig. I.1** y **I.2**). Cuanto mayor fue la concentración de Cr en el agua, mayor fue la concentración final de Cr en los tejidos vegetales (partes aéreas y raíces). Las mayores concentraciones de Cr se detectaron en las raíces (**Fig. I.2**). La mayor acumulación de Cr se observó en las partes aéreas durante las primeras 48 hs para las dos concentraciones más altas, mientras que para las dos concentraciones más bajas, la mayor acumulación se produjo en las primeras 24 hs (**Fig. I.1**). Sin embargo, la mayor acumulación de Cr en las raíces se produjo en las primeras 24 hs para todas las concentraciones de Cr en agua (**Fig. I.2**).

De acuerdo con los FTs calculados (entre 0,02 y 0,06), el Cr no fue fácilmente translocado a las partes aéreas (**Tabla I.1**).



**Figura I.1:** Acumulación de Cr en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.



**Figura I.2:** Acumulación de Cr en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

Concentración de Cr en agua (mg l <sup>-1</sup> )	Tiempo de exposición (hs)		
	24	48	72
2	0,033	0,037	0,032
4	0,019	0,037	0,041
6	0,033	0,019	0,042
8	0,032	0,026	0,060

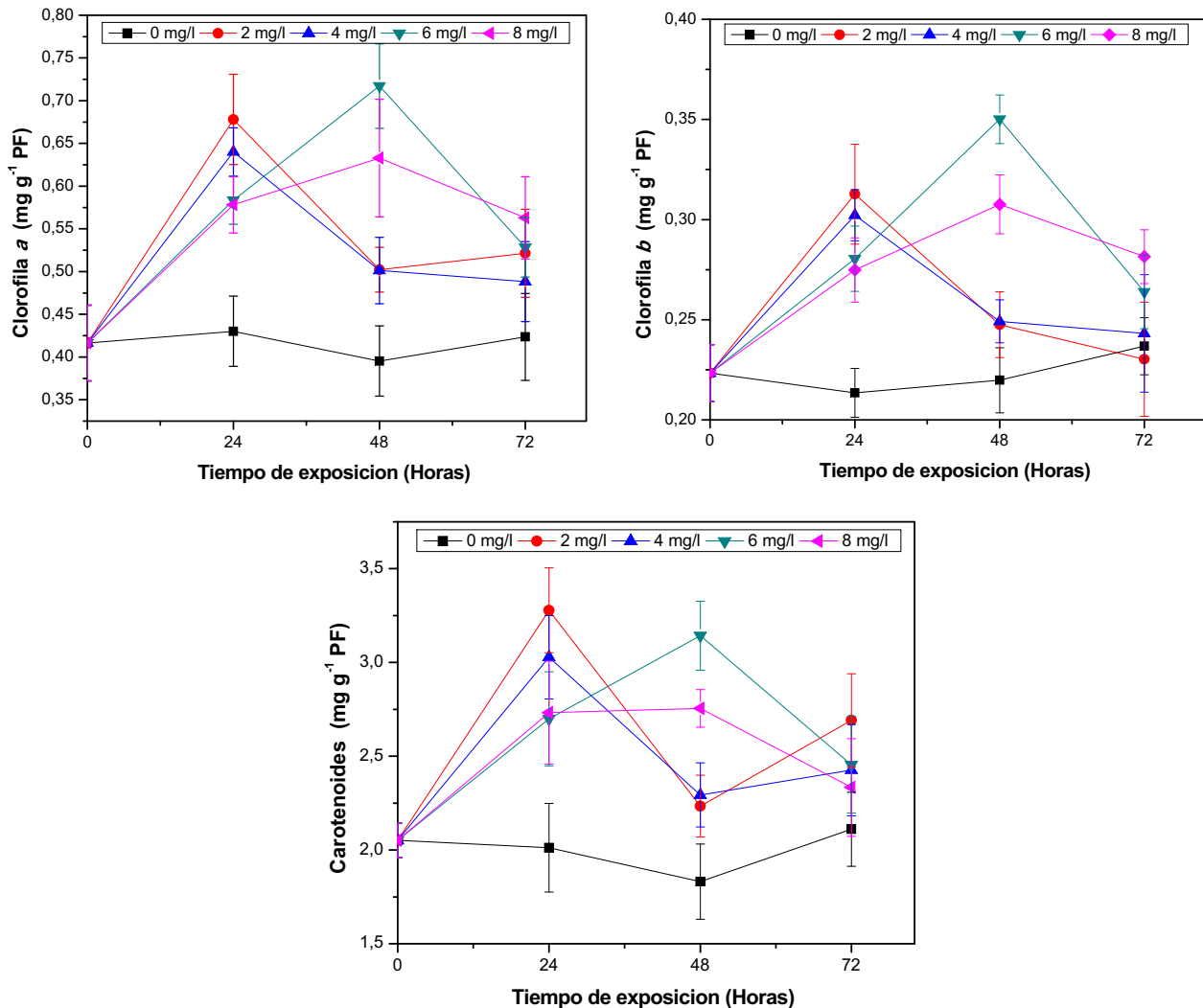
**Tabla I.1:** Factor de Translocación por acumulación de Cr en plantas.

### *Efectos del Cr sobre los pigmentos fotosintéticos*

La exposición a Cr en las macrófitas produjo respuestas fisiológicas importantes. Clorofila *a* y *b* exhibieron un incremento significativo para todas las concentraciones y tiempos de exposición analizados (**Fig. I.3**). Sin embargo, clorofila *a* para 2 y 4 mg l<sup>-1</sup> de Cr a las 72 hs, clorofila *b* para 2 mg l<sup>-1</sup> de Cr a las 48 hs y 2, 4 y 6 mg l<sup>-1</sup> de Cr a las 72 hs, no mostraron diferencias significativas en comparación con el control. Las mayores concentraciones de clorofila *a* y *b* se observaron a las 24 hs para las dos concentraciones más bajas de Cr y a las 48 hs para las dos concentraciones más elevadas de Cr utilizadas. A las 72 hs, las concentraciones de clorofila *a* y *b* se redujeron en comparación con las obtenidas a las 24 y 48 hs, pero sin diferencias significativas respecto al control.

Se observó un aumento significativo en las concentraciones de carotenoides para todas las concentraciones de Cr a las 24 y 48 hs, seguido de una disminución a las 72 hs, sin diferencias

significativas respecto al control. Esta respuesta también estuvo de acuerdo con la observada para las concentraciones de clorofilas *a* y *b*.



**Figura I.3:** Efectos del Cr sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

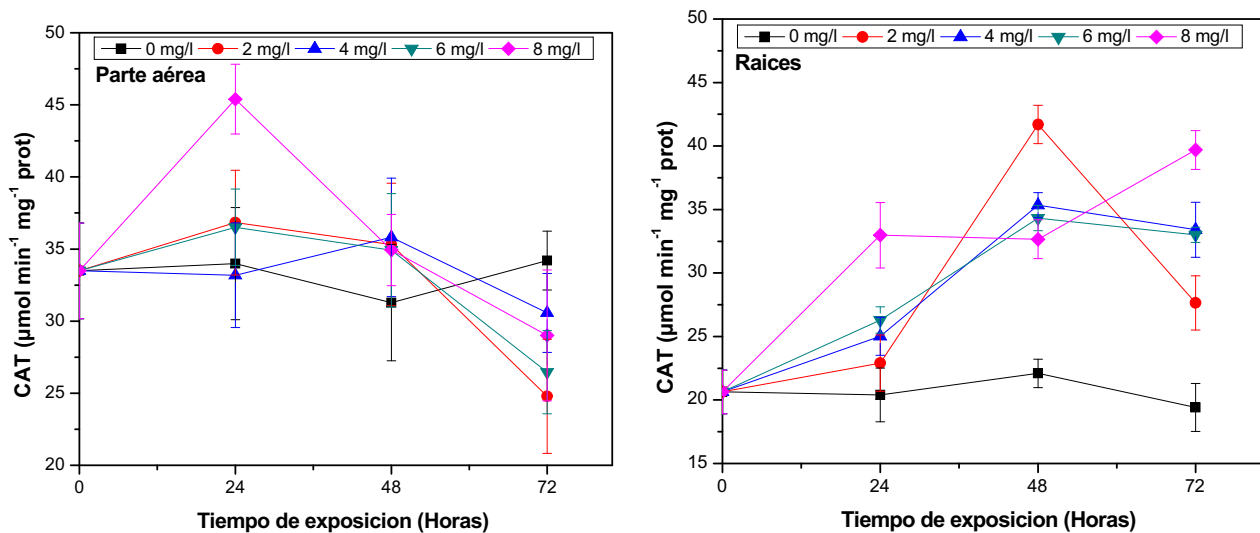
#### ***Efectos del Cr sobre la actividad de CAT, POD, SOD y GR.***

Las actividades de las enzimas antioxidantes se vieron afectadas por la exposición de *E. crassipes* a Cr (III), tanto en las raíces como partes aéreas (**Fig. I.4**).

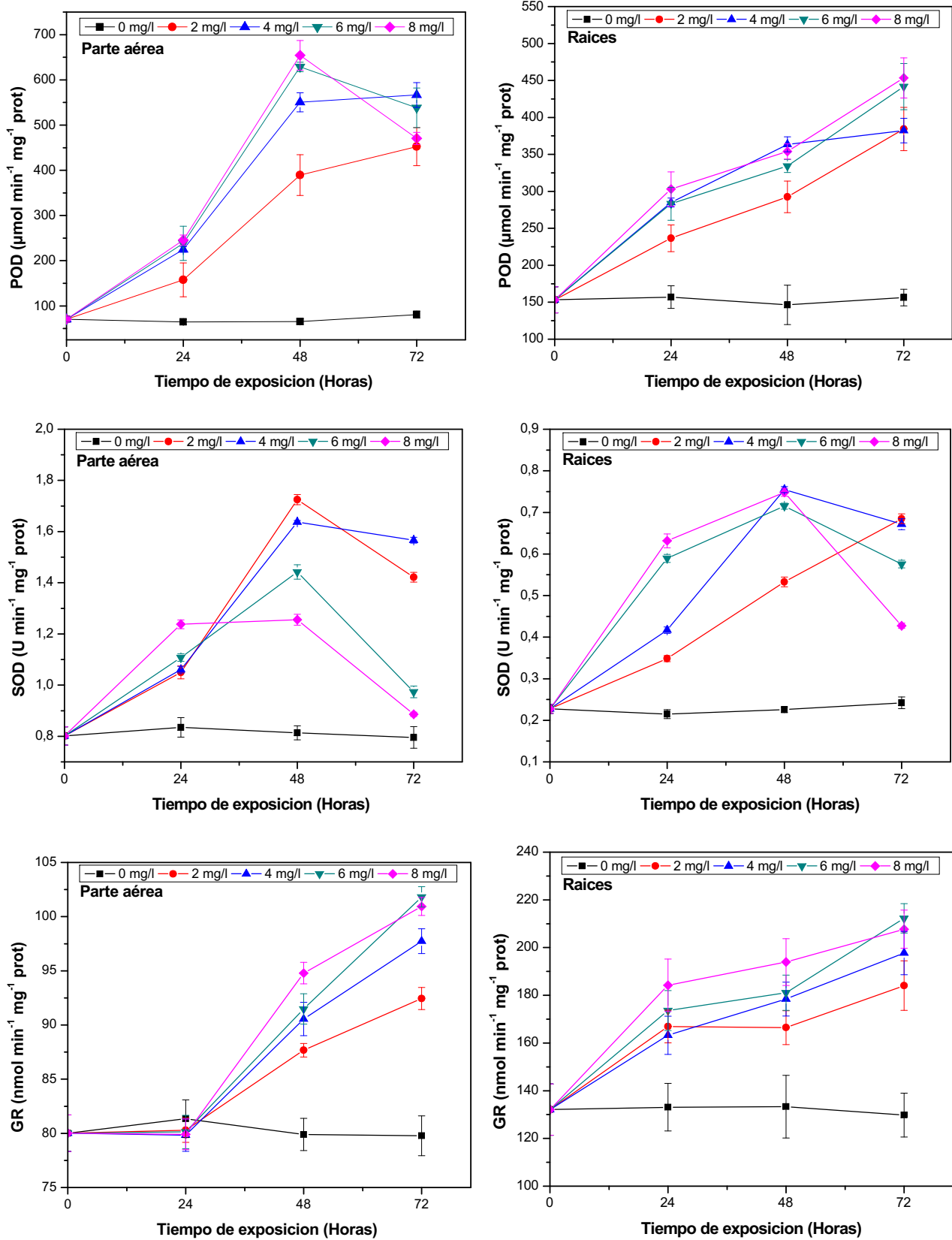
La actividad de CAT aumentó significativamente sólo a las 24 hs para 8 mg l<sup>-1</sup> de Cr ( $45,39 \pm 2,42$  mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot) en las partes aéreas, disminuyendo por debajo de los valores del control después de 72 hs de exposición. La actividad de POD mostró un aumento significativo respecto al control para todos los tratamientos y tiempos de exposición analizados. Sin embargo, es importante señalar que la actividad de POD mostró una tendencia de concentración-respuesta en forma de campana para las concentraciones de 6 y 8 mg l<sup>-1</sup> de Cr: el nivel de actividad aumentó acompañado del aumento de las concentraciones de Cr, hasta un valor máximo y luego disminuyó. Esta disminución

se observó a las 72 hs de exposición. De manera similar a POD, la actividad de SOD aumentó significativamente en todos los tratamientos, mientras que a las 72 hs mostró una disminución en comparación con los otros tiempos, lo que indica una tendencia de concentración-respuesta en forma de campana, excepto para la concentración de 8 mg l<sup>-1</sup> de Cr. Se observó un aumento significativo en la actividad de GR sólo a las 48 y 72 hs.

En las raíces, la actividad CAT aumentó significativamente en todos los tratamientos. A las dos concentraciones más bajas de Cr, la enzima CAT mostró una respuesta en forma de campana con una actividad máxima a las 48 hs y una disminución a las 72 hs. Se observó un aumento significativo en comparación con el control para la actividad de POD para todos los tratamientos de Cr. En los diferentes tiempos de exposición, se observó un aumento de la actividad de POD al aumentar la concentración inicial del metal en agua. La actividad de SOD aumentó significativamente en todos los tratamientos y presentó una respuesta en forma de campana, a excepción de la concentración de 2 mg l<sup>-1</sup> de Cr. Se observaron concentraciones máximas de actividad de SOD a las 48 hs para las concentraciones de 4, 6 y 8 mg l<sup>-1</sup> de Cr. La actividad de GR aumentó significativamente para todas las concentraciones de Cr y tiempos de exposición. El patrón de la respuesta de la enzima GR fue similar a la respuesta de POD, que muestra un aumento de la actividad en función del aumento de la concentración de Cr en agua.





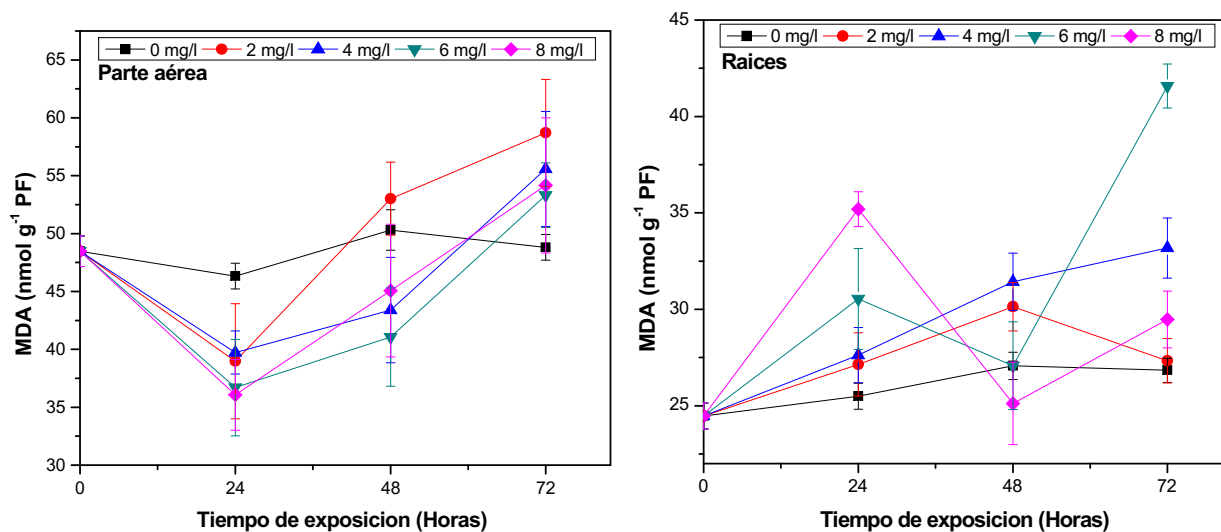


**Figura I.4:** Efectos del Cr sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en parte aérea y raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

### *Efectos del Cr sobre la peroxidación de lípidos*

Los efectos del Cr sobre la concentración de MDA se presentan en la **Fig. I.5**. En comparación con los controles, las concentraciones de MDA disminuyeron significativamente en las partes aéreas a las 24 y 48 hs para todos los tratamientos, excepto para 2 mg l<sup>-1</sup> de Cr a las 48 hs, los cuales no mostraron diferencias significativas respecto al control. La magnitud de la reducción del MDA varió de 10 a 22% con respecto al control. Sin embargo, se observó un aumento significativo a las 72 hs para todas las concentraciones de Cr, lo que indica un aumento de la peroxidación de lípidos en este tiempo. Se observó que el aumento máximo de MDA fue para la concentración de 2 mg l<sup>-1</sup> de Cr ( $58,70 \pm 4,63$  nmol g<sup>-1</sup> PF) a las 72 hs.

En las raíces, la concentración de MDA aumentó significativamente en 24 hs a las concentraciones más elevadas de Cr (4, 6 y 8 mg l<sup>-1</sup>), lo que indica un aumento en la peroxidación de lípidos con el aumento de las concentraciones de Cr. Se observó el mayor incremento (38% por encima del control) a la exposición de 8 mg l<sup>-1</sup> de Cr. Mientras que, se observó una respuesta en forma de campana a las 48 y 72 hs, observándose los mayores incrementos a las 48 hs (4 mg l<sup>-1</sup> de Cr) y a las 72 hs (6 mg l<sup>-1</sup> de Cr).



**Figura I.5:** Efectos del Cr sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en parte aérea y raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

#### **12.1.4 Discusión**

Aunque el Cr (III) es un elemento no esencial para las plantas, *E. crassipes* acumuló este metal de manera eficiente, especialmente a bajas concentraciones, en concordancia con lo observado por otros autores (Delgado y col., 1993, Soltan y Rashed, 2003).

*E. crassipes* acumuló mayores concentraciones de Cr en las raíces que en las partes aéreas de la planta, lo cual ha sido también observado para otros metales (Ingole y Bhole 2003, Maine, et al 2004,

Paiva y col., 2009, Mangabeira y col., 2011, Hadad y col., 2011). La baja concentración del metal en las partes aéreas de *E. crassipes* puede ser debido a la lenta movilidad del metal después de ser tomado por las raíces. Zhang y col. (2008) emplearon la espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) para estudiar las paredes de las células de la raíz de las plantas tratadas con Cr, sugiriendo que -OH y COO- se asociaron con Cr en soluciones acuosas, lo que podría constituir un mecanismo para la acumulación de Cr. Mangabeira y col. (2004) emplearon microscopía iónica detectando grandes cantidades de Cr en el cilindro vascular de *E. crassipes*, tanto en raíces como tallos. Además, estos autores observaron Cr en el parénquima de transporte, lo que indica que estas células eran responsables de llevar el metal desde las raíces hasta las hojas.

La acumulación de Cr puede reducir el crecimiento, inducir clorosis en las plantas jóvenes, reducir la concentración de pigmentos y causar modificaciones ultraestructurales de los cloroplastos y las membranas celulares (Barton y col., 2000, Chatterjee y Chatterjee, 2000, Cervantes y col., 2001, Panda y Choudhury, 2005). Sin embargo, en esta experiencia, la concentración de pigmentos fotosintéticos aumentó a bajas concentraciones de Cr después de la exposición a corto plazo. En coincidencia con nuestros resultados, Paiva y col. (2009) encontraron que el Cr (III) podría eventualmente aumentar la fotosíntesis y la concentración de clorofila. En otro estudio, El-Bassam (1978) informó que el Cr (III) a bajas concentraciones promueve el crecimiento vegetal y también estimula la síntesis de clorofila y la actividad fotosintética. Observaciones similares fueron hechas por Bonet y col. (1991), quienes encontraron que las bajas concentraciones de Cr (III) pueden aumentar la concentración de clorofila mediante la mejora de la disponibilidad de Fe biológicamente activo en el tejido vegetal. Se sabe que las concentraciones bajas o moderadas de metales pesados no afectan o incluso mejoran algunas funciones metabólicas tales como la nutrición mineral, fotosíntesis y el crecimiento, mientras que mayores concentraciones de metal reducen las funciones metabólicas (Mysliwa-Kurczel y col., 2004, Gratão y col., 2005). Este fenómeno, que describe que las sustancias pueden ser beneficiosas en bajas concentraciones y letal a más altas, se ha explicado hace más de un siglo como la ley de Arndt-Schulz (Schulz, 1887). Luego fue introducido el término "hormesis" (Southam y Erhlich, 1943) como una perturbación de la homeostasis, en los organismos, debido al estrés ambiental inducido. Algunos autores han propuesto que la hormesis podría ser desencadenada por ciertos tipos de estrés, como aquellos que desatan la sobreproducción de ROS (Cedergreen y col., 2007). Por esta razón, se analizó la actividad de enzimas asociadas con el estrés oxidativo como biomarcadores para detectar la toxicidad inducida por el metal.

Las ROS se producen en las plantas como resultado de las principales reacciones enzimáticas, pero también parecen ser un accidente inevitable, por ejemplo, el  $O_2^{\cdot-}$  formado por la cadena de transporte de electrones del cloroplasto. Aunque las concentraciones fisiológicas de ROS tienen

funciones importantes en las señales de estrés, las cantidades en exceso pueden causar estrés oxidativo, que de mantenerse, conduce a la muerte celular. Los lípidos de membrana son las principales dianas celulares en ser susceptibles a daño oxidativo, siendo la peroxidación de lípidos un proceso mediado por radicales libres (Repetto y col., 2012, Sharma y col., 2012). El Cr (III) puede perturbar el equilibrio entre la generación de ROS y su eliminación, lo que causa la acumulación de MDA en las plantas, resultando en un daño oxidativo. Como un mecanismo de defensa, las enzimas antioxidantes juegan un papel importante en la protección de las células ante las ROS. En esta experiencia, las concentraciones más altas de Cr indujeron un aumento significativo, en las partes aéreas, de MDA a las 72 hs, indicando la presencia de estrés oxidativo. Por otro lado, se observó una disminución significativa en la concentración de MDA a las 24 y 48 hs, respecto al control, lo cual indicaría que un mejor mecanismo protector puede estar operando en las plantas a tiempos tempranos. En las raíces, se observó un aumento en las concentraciones de MDA asociado con el aumento de las concentraciones de Cr en agua a las 24 hs, revelando el daño oxidativo a lípidos. En general, una respuesta en forma de campana, fue observada en las actividades enzimáticas. Un aumento significativo en las actividades enzimáticas para las dos concentraciones más bajas de Cr y una disminución para las dos concentraciones más altas de Cr, fue observado. Esta disminución podría ser interpretada como un signo de citotoxicidad debido a un exceso de producción de ROS que llevó a una caída en la actividad del sistema antioxidante que no pudo evitar el daño inducido por el metal. La inducción de las actividades de un grupo particular de enzimas se considera que desempeña un papel importante en la estrategia de defensa celular contra el estrés oxidativo (Van Assche y col., 1990, Møller y col., 2007). El aumento de las actividades enzimáticas antioxidantes observado en *E. crassipes*, le proporcionó en cierta manera la capacidad de adaptarse a moderadas concentraciones de Cr.

La presencia de una respuesta hormética podría ser establecida por la relación entre la acumulación de Cr y la activación de la defensa antioxidante. Este efecto hormético podría ser debido a la adaptación de las plantas a través de la activación de las defensas por señalización cruzada, ya que un mecanismo de defensa implica la existencia de sistemas sensores de metal que regulan la expresión de genes a través de cascadas de transducción de señales celular (Poschenrieder y col., 2013). Es importante señalar que este estudio no se llevó a cabo con el objetivo de investigar la posible respuesta hormética sino para dilucidar los efectos del Cr sobre la fisiología y bioquímica de *E. crassipes*. También es importante destacar que el presente estudio se realizó bajo condiciones controladas de laboratorio donde se utilizó agua de red como medio. Poschenrieder y col. (2013) establecieron que las plantas utilizadas para experimento en laboratorio, incluso bajo condiciones controladas tienen tasas de crecimiento subóptimas debido a los estreses latentes, suponiendo que sus rendimientos son

los mejores. Sin embargo, estas circunstancias pueden hacer que las bajas concentraciones de iones tóxicos contribuyan a la reducción de estrés y la estimulación del crecimiento. Por lo tanto, los contaminantes pueden inducir respuestas homeostáticas beneficiosas con un espaciado adecuado de las dosis y concentraciones usadas, siendo responsables de incrementar la habilidad de defensa y el reparo del daño celular en organismos (Calabrese y Baldwin 2003a, b).

## **12.2 Experiencia N° 2: Acumulación de Ni (II) y sus efectos sobre *Eichhornia crassipes***

### **12.2.1 Introducción**

El níquel es considerado un micronutriente esencial para las plantas (Eskew, 1983, Marschner, 1995, Ragsdale, 1998) ya que es un constituyente de enzimas implicadas en el metabolismo y la fijación biológica del nitrógeno, siendo también el ion central en el centro activo de la ureasa (Watt y Ludden, 1999). La sorción de níquel en las plantas se lleva a cabo principalmente por los sistemas de raíces a través de difusión pasiva, así como por transporte activo (Seregin y Kozhevnikova, 2006, Chen y col., 2009). Sin embargo, estos mecanismos de sorción varían de acuerdo a las especies de plantas, el compuesto de níquel y su concentración en la solución (Vogel-Mikuš y col., 2005). Por arriba de las concentraciones umbrales, el níquel puede resultar tóxico para las plantas (Parida y col., 2003, Gajewska y Sklodowska, 2005, Drzewiecka y col., 2012). No obstante, el sistema enzimático antioxidante puede ser estimulado bajo estrés por Ni, ayudando esto a la tolerancia del mismo (Baccouch y col., 1998, Randhawa y col., 2001, Gajewska y Sklodowska, 2007, Jócsák y col., 2008, Wang y col., 2009).

Recientemente cambios ecofisiológicos y bioquímicos en plantas acuáticas expuestas a níquel, han sido estudiados. Maleva y col. (2004) analizaron concentraciones de Ni entre 0.025 y 0.25 mg ml<sup>-1</sup>, concluyendo que dichas concentraciones afectaron la fotosensibilización y causaron una disminución en la velocidad de fotosíntesis en plantas flotantes y sumergidas. Zhao y col. (2008) expusieron *Hydrocharis dubia* a concentraciones de Ni entre 0.5 y 4 mM, concluyendo que el Ni fue fuertemente fitotóxico a las altas concentraciones estudiadas. Singh y Pandey (2011) expusieron *Pistia stratiotes* a concentraciones de Ni entre 0.01 y 10 mg l<sup>-1</sup>, demostrando que Ni ocasionó síntomas de toxicidad visibles a altas concentraciones y también un incremento de las actividades de las enzimas antioxidantes a bajas concentraciones de Ni. Doganlar y col. (2012) informaron que concentraciones de Ni entre 0.25 y 16 mg l<sup>-1</sup> causó estrés oxidativo en *Lemna gibba*. Sin embargo, existen escasos reportes sobre los efectos del Ni sobre *E. crassipes*. Hadad y col. (2009, 2011) evaluaron la exposición

de *E. crassipes* a  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de Ni, durante el período de 30 días, observando un efecto negativo sobre de la longitud media de la raíz, el número de hojas, la biomasa y la concentración de clorofila.

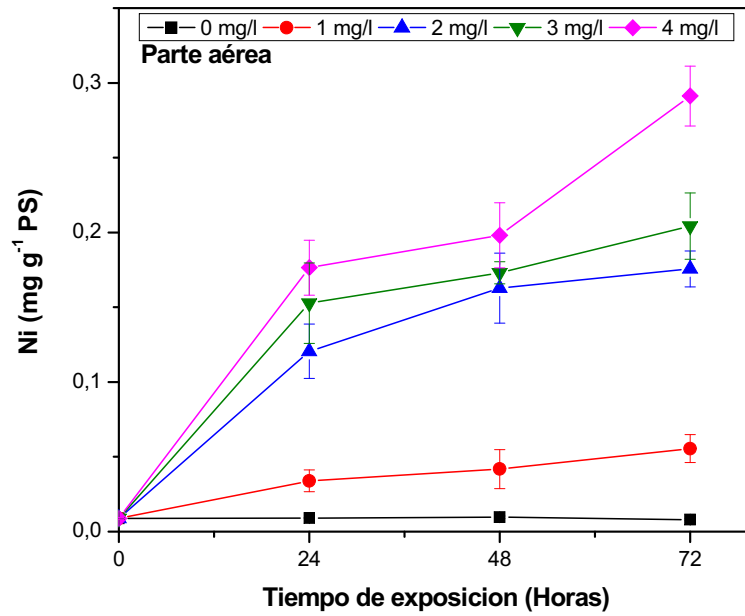
### ***12.2.2 Metodología***

Las plantas fueron aclimatadas en el laboratorio bajo condiciones controladas, explicadas en la sección de Metodología. Dos litros de agua de red de clorada y una planta (30 a 40 g de biomasa de planta fresca) fueron dispuestos en reactores experimentales de plástico. La solución de Ni (II) (preparada usando  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , marca Merck) fue agregada para obtener concentraciones de 1, 2, 3 y  $4 \text{ mg l}^{-1}$  finales. El pH del agua se mantuvo entre 6.3 y 6.5 (usando HCl e Na (OH)) para evitar la precipitación del metal. La duración de la exposición fue de 3 días, tomándose muestras cada 24 hs.

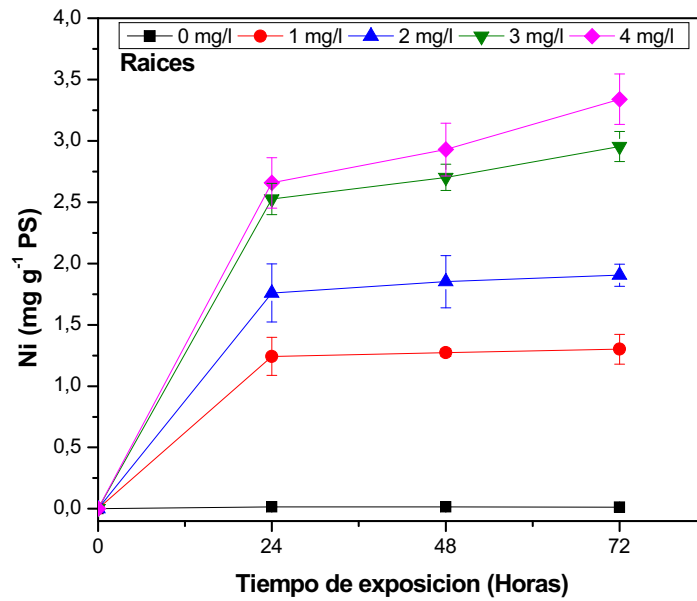
### ***12.2.3 Resultados***

#### ***Acumulación de Ni y translocación***

La concentración de Ni en los tejidos de las plantas (partes aéreas y raíz), incrementó tanto en términos de tiempo de exposición y concentración inicial del metal en agua (**Fig. I.6 y I.7**). Las mayores concentraciones de Ni se determinaron en las raíces, siendo encontradas concentraciones 10 veces más altas que en las partes aéreas. La mayor acumulación de Ni fue observada durante las primeras 24 hs tanto en partes aéreas como en raíces. Las concentraciones de Ni en las partes aéreas continuó incrementando significativamente a lo largo del tiempo. En raíces, la concentración de Ni no incrementó significativamente a lo largo del tiempo luego de las primeras 24 hs para las dos concentraciones más bajas de Ni, mientras que siguió aumentando para las dos más altas concentraciones. De acuerdo con los FTs calculados (entre 0,027 y 0,093), el Ni no fue fácilmente translocado a las partes aéreas (**Tabla I.2**).



**Figura I.6:** Acumulación de Ni en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.



**Figura I.7:** Acumulación de Ni en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

Concentración de Ni en agua (mg l <sup>-1</sup> )	Tiempo de exposición (hs)		
	24	48	72
1	0,027	0,033	0,043
2	0,068	0,093	0,092
3	0,060	0,062	0,072
4	0,066	0,068	0,087

**Tabla I.2:** Factor de Translocación por acumulación de Ni en plantas.

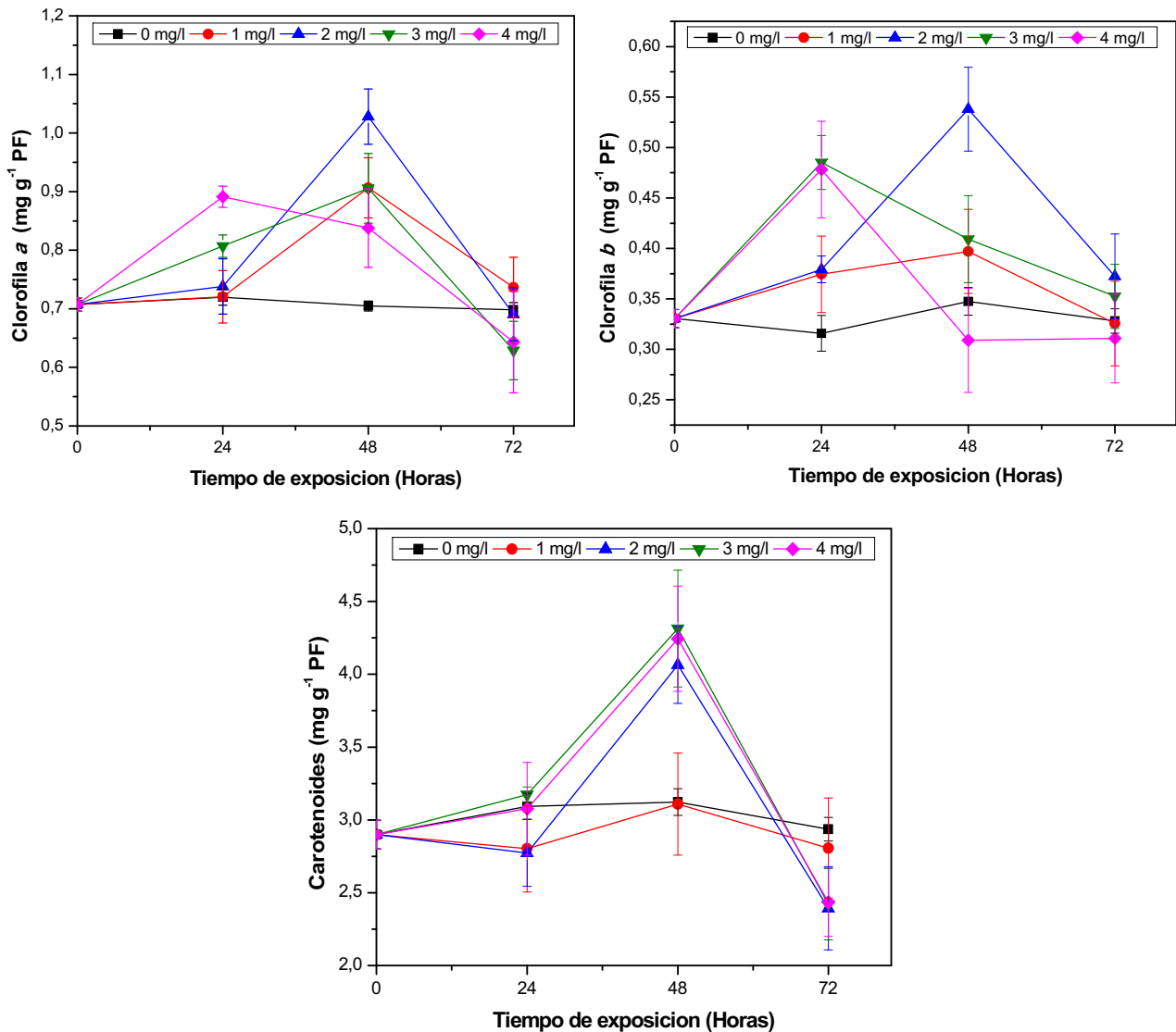
### *Efectos del Ni sobre los pigmentos fotosintéticos*

La concentración de los pigmentos fotosintéticos fue significativamente afectada por los diferentes tratamientos con Ni en *E. crassipes* (**Fig. I.8**). Los tratamientos de 3 y 4 mg l<sup>-1</sup> de Ni produjeron un incremento significativo en las concentraciones de Cl *a* en las primeras 24 hs. Comparando con el control, un incremento significativo en las concentraciones de Cl *a* fue observado para todos los tratamientos a las 48 hs. Este incremento observado en Cl *a* varió entre 12.11-45.85 % por sobre los valores del control. Luego, las concentraciones de Cl *a* disminuyeron para todos los tratamientos con Ni a las 72 hs, aun así, sin presentar diferencias significativas con el control.

Respecto del control, la concentración de Cl *b* incrementó significativamente para todos los tratamientos de Ni a las 24 hs, mientras que solo presentó diferencias significativas para las concentraciones de 2 y 3 mg l<sup>-1</sup> de Ni a las 48 hs. Incrementos por más del 50% sobre el control fueron observados a las 24 hs (3 y 4 mg l<sup>-1</sup> de Ni) y 48 hs (2 mg l<sup>-1</sup> de Ni). Luego, a las 72 hs las concentraciones de Cl *b* disminuyeron para todos los tratamientos de Ni en comparación con las observadas en los otros tiempos de exposición, pero sin diferencias significativas con el control.

Las concentraciones de carotenoides incrementaron significativamente para las tres concentraciones más altas de Ni a las 48 hs. Luego, las concentraciones de carotenoides disminuyeron significativamente para los tratamientos de 2, 3 y 4 mg l<sup>-1</sup> de Ni a las 72 hs. La exposición a la menor concentración de Ni no mostró diferencias significativas con el control a lo largo del experimento.





**Figura I.8:** Efectos del Ni sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

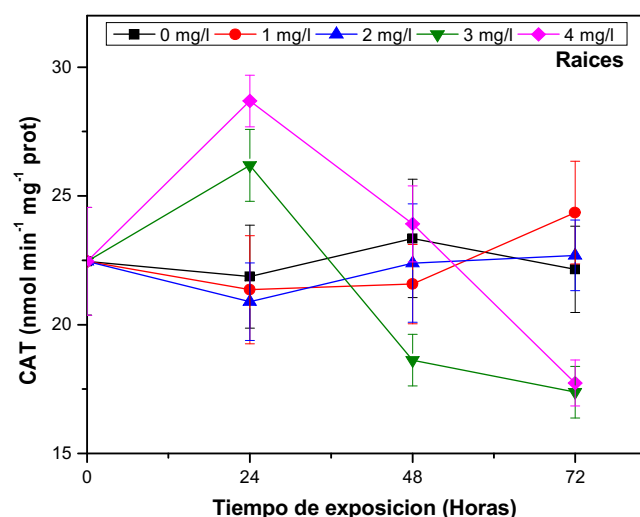
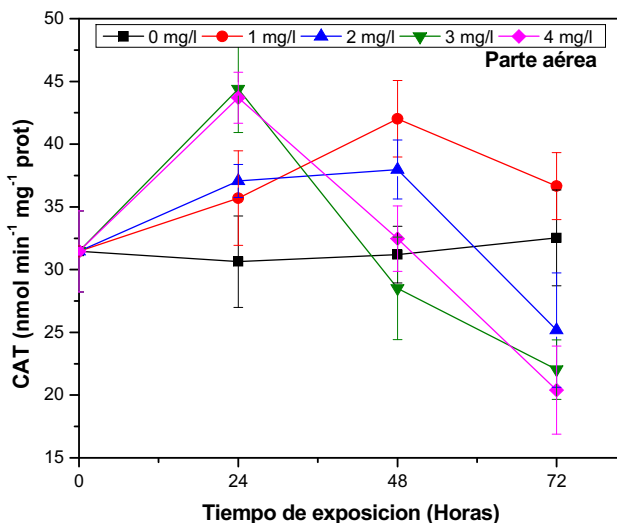
#### ***Efectos del Ni sobre la actividad de CAT, POD, SOD y GR.***

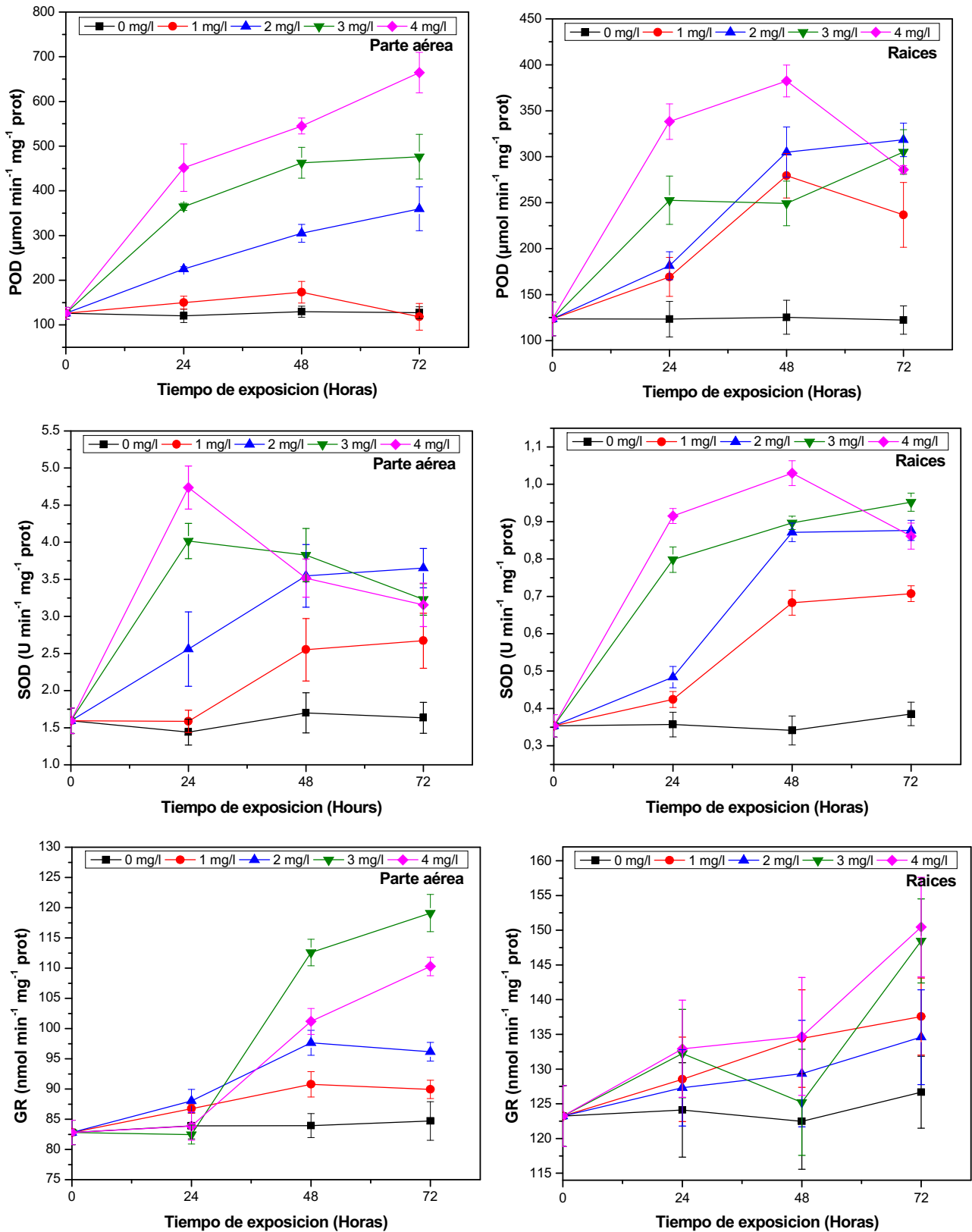
Las actividades de las enzimas antioxidantes se vieron afectadas por la exposición a Ni (II) tanto en las raíces como partes aéreas (**Fig. I.9**).

En la parte aérea, la actividad de la enzima CAT incrementó significativamente solo a las 24 hs para las dos concentraciones más altas de Ni y a las 48 hs para las dos más bajas concentraciones. Este incremento observado varió entre 15.33-44.91 % sobre los valores del control. Una disminución significativa de alrededor del 32 % por debajo de los valores del control fue observada luego de 72 hs de exposición, para las dos más altas concentraciones de Ni. En la parte aérea, existió un incremento significativo en la actividad de la enzima POD con el incremento de las concentraciones de Ni y los tiempos de exposición, excepto para el tratamiento de 1 mg l<sup>-1</sup> de Ni. Los incrementos observados

variaron entre 87.02-420.83 % sobre el control. La actividad de la enzima SOD incrementó significativamente para todos los tratamientos, excepto para el tratamiento con 1 mg l<sup>-1</sup> de Ni a las 24 hs. Es importante señalar que para las dos más bajas concentraciones de Ni la actividad de SOD incrementó durante las primeras 48 hs y luego se mantuvo casi constante. Mientras que, para las dos más altas concentraciones de Ni, la actividad SOD incrementó significativamente durante las primeras 24 hs, para luego disminuir. Los incrementos observados variaron entre 49.99-228.86 % sobre los valores del control. La actividad de la enzima GR mostró un incremento significativo para todos los tratamientos con Ni a las 48 hs de exposición. Luego, para las dos más bajas concentraciones de Ni, la actividad de GR se mantuvo casi constante, siendo significativamente inferior a las actividades de GR obtenidas para las dos más altas concentraciones de Ni al final del experimento.

En raíz, la actividad de CAT en los tratamientos con las dos más bajas concentraciones de Ni no mostró diferencias significativas con el control a lo largo del tiempo. Mientras que, un incremento significativo se observó en la actividad de CAT a las 24 hs para las dos más altas concentraciones de Ni, seguido por una disminución de la actividad enzimática. A las 72 hs, la actividad de CAT disminuyó significativamente por más del 20 % respecto del control. Las actividades de SOD y POD incrementaron significativamente respecto del control para todos los tratamientos con Ni y tiempos de exposición. La actividad de POD aumentó entre el 47.13 y el 205.11 % sobre el control. Mientras que, la actividad de SOD aumentó entre el 30.67 y el 201.77 % sobre el control. No se observaron cambios significativos durante las 48 hs en las actividades de GR, en raíz. Sin embargo, un incremento significativo fue observado para las dos más altas concentraciones de Ni a las 72 hs.





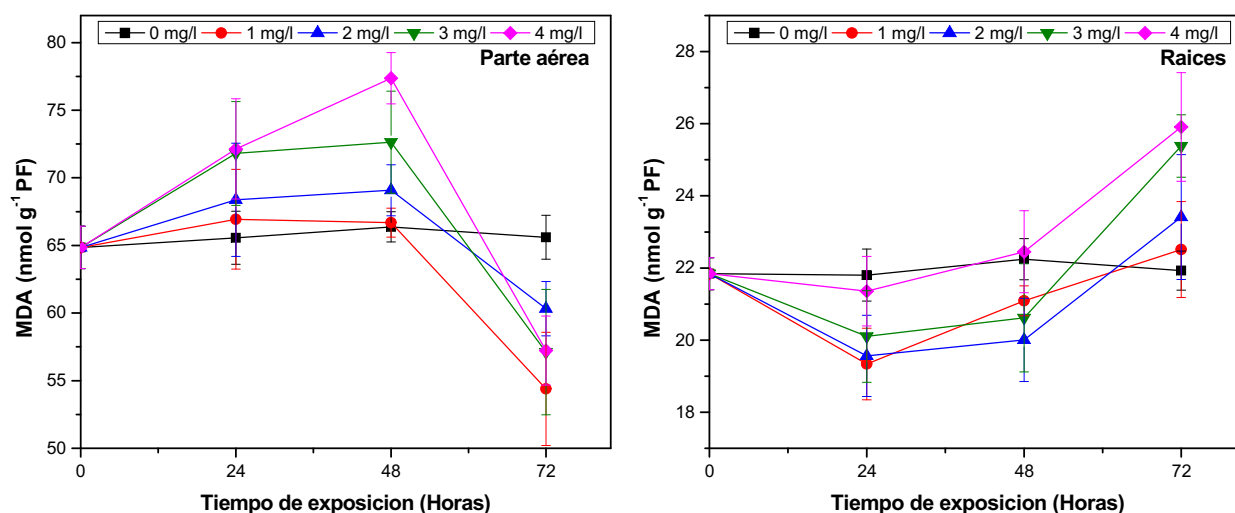
**Figura I.9:** Efectos del Ni sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en parte aérea y raíz.

Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

*Efectos del Ni sobre la peroxidación de lípidos*

Los efectos del Ni sobre la concentración de MDA se presentan en la **Fig. I.10**. En la parte aérea un incremento significativo fue observado en las primeras 48 hs para las dos más altas concentraciones de Ni, mientras que la concentración de MDA para las dos más bajas concentraciones de Ni no presentó diferencias significativas con el control. La concentración de MDA disminuyó significativamente a las 72 hs para todos los tratamientos realizados.

En raíz, una disminución significativa en la peroxidación lipídica fue observado durante las primeras 48 hs, excepto para las más altas concentraciones de Ni. Las concentraciones de MDA aumentaron significativamente a las 72 hs para todos los tratamientos, no presentando diferencias significativas con el control a las dos más bajas concentraciones de Ni tratadas. Sin embargo, a las dos más altas concentraciones de Ni, la concentración de MDA fue significativamente mayor que las del control, observándose un aumento en la peroxidación lipídica con el aumento en las concentraciones de Ni a la que es expuesta la planta.



**Figura I.10:** Efectos del Ni sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en parte aérea y raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

#### 12.2.4 Discusión

*E. crassipes* mostró una concentración de Ni significativamente mayor en las raíces que en las partes aéreas, lo cual concuerda con lo previamente informado en la bibliografía (Turnquist y col., 1990, Zhu y col., 1999, Soltan y Rashed, 2003, Hadad y col., 2009, 2011, Hammad, 2011). Tanto en parte aérea como en raíz, la mayor acumulación de Ni ocurrió en las primeras 24 hs. Luego, la concentración de Ni en raíz continuó aumentando lentamente para las dos concentraciones más altas de tratamiento. Esta rápida sorción inicial de Ni, seguida de una fase lenta está de acuerdo con los descrito por Turnquist y col. (1990), quienes encontraron que *E. crassipes* sometida a una exposición a Ni exhibió dos fases de sorción, lo que sugiere que a mayores concentraciones de Ni los sitios de

intercambio iónico en las raíces (proceso de difusión) se saturan rápidamente, haciendo que el proceso de sorción se frene (Turnquist y col., 1990).

Los valores de TFs indicaron una pobre translocación de Ni. Se ha informado ampliamente que los metales se acumulan en los tejidos de la raíz como una estrategia de tolerancia (Taylor y Crowder, 1983, Sinha y Gupta, 2005, Hadad y col., 2009, 2011, Mufarrege y col., 2010, Vymazal, 2011, Hechmi y col., 2014). Además, Seregin y Kozhevnikova (2006) informaron que la retención de Ni en las raíces puede deberse a la retención en los sitios de intercambio de cationes de las paredes de las células del parénquima del xilema y la inmovilización en las vacuolas de las células. El confinamiento del metal en las raíces es conocido por ser un proceso de defensa primario con el fin de proteger el aparato fotosintético en las hojas (Drażkiewicz y Baszyński, 2005).

La concentración de pigmentos fotosintéticos en las plantas es un buen indicador de la toxicidad de los diferentes metales (Burton y col., 2004, Kolotov y col., 2004). El deterioro de la maquinaria fotosintética en plantas expuestas a un exceso de Ni, ha sido informado en la literatura (Seregin y Kozhevnikova, 2006). Aun así, en nuestro estudio, las concentraciones de clorofila presentan incrementos significativos respecto del control a las 24 y 48 hs de exposición, disminuyendo a las 72 hs, pero sin mostrar diferencias significativas con el control. Una respuesta similar observó Gopal y col. (2002), quienes encontraron que a una concentración de Ni de 5.87 mg l<sup>-1</sup> o más baja, plantas de *Vigna radiata* mostraron un crecimiento positivo y un aumento en las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos. En el mismo sentido, el incremento en la concentración de pigmentos fotosintéticos puede ser debido a una mejora en la asimilación urea-N por el suplemento de Ni, porque la clorofila es un compuesto que contiene N (Barker, 1989). La concentración de carotenoides también mostró un aumento significativo a las 48 hs, seguido de una disminución significativa a las 72 hs. Esta respuesta no fue sorprendente, considerando que los carotenoides no solo son componentes esenciales del aparato fotosintético, sino que también son protectores esenciales contra el daño fotooxidativo, actuando como eliminadores de radicales libres evitando la peroxidación de lípidos (Hou y col., 2007). La disminución de la concentración de carotenoides observada a las 72 hs podría ser resultado de un aumento de la degradación oxidativa de este pigmento por el estrés oxidativo impuesto.

Se sabe que si las concentraciones de Ni se elevan por encima del límite tolerable por la planta, el metal puede inducir la generación de ROS en la misma (Boominathan y Doran, 2002) y por lo tanto se puede generar estrés oxidativo, como se evidencia en la presente investigación y otras (Pillay y col., 1996, Gonnelli y col., 2001, Gajewska y col., 2006). Las discrepancias entre los datos relativos a la respuesta de las enzimas antioxidantes de la planta ante el estrés por Ni, pueden explicarse por las diferencias en la tolerancia de la planta, las variaciones de las condiciones de experimentación, así como las concentraciones de Ni utilizadas. En la literatura podemos encontrar información sobre las

respuestas de defensa antioxidantes de *E. crassipes* al tratamiento con metales pesados (Odjegba y Fasidi, 2007, Narang y col., 2008a,b, González y col., 2014, Malar y col., 2014, Puzon y col., 2014). En nuestro estudio, las enzimas antioxidantes mostraron respuesta variables a diferentes concentraciones de Ni y tiempos de exposición. Un aumento significativo generalizado de las actividades de CAT, POD, SOD y GR, fue observado. Este incremento de las actividades de las enzimas antioxidantes en respuesta a la exposición a Ni, también se ha informado en plantas de cultivo tales como *Zea mays* (Baccouch y col., 1998) y *Oryza sativa* (Maheshwari y col., 2009) y en macrófitas como *Hydrilla verticillata* (Sinha y col., 2003), *Nasturtium officinale* (Duman y Ozturk, 2010), *Pistia stratiotes* (Singh y col., 2011) y *Lemna gibba* (Doganlar y col., 2012). Es importante señalar que CAT tuvo una disminución significativa en la actividad tanto en la parte aérea como en raíz para las concentraciones más altas de Ni, al final del experimento. Esta disminución podría deberse a un exceso de producción de ROS, probablemente mediante la inactivación de la enzima unida al grupo hemo (Willekens y col., 1995).

El MDA es el principal producto de la peroxidación lipídica en las plantas están bajo estrés oxidativo y se utiliza a menudo como un indicador de la extensión del daño oxidativo (Chen y col., 2009). En el presente estudio, la concentración de MDA aumentó significativamente en las partes aéreas en las primeras 48 hs, para las dos concentraciones más altas de Ni. Esto podría ser debido a que las partes aéreas de la planta son más sensibles a las ROS, cuyo aumento fue causado por el aumento de la concentración de Ni en este tejido. Sin embargo, el aumento significativo observado en las actividades de las enzimas antioxidantes, resultó en una disminución del daño oxidativo, lo cual se evidencia por una disminución en la concentración de MDA al final del experimento. Esta respuesta también se observó cuando se expuso *E. crassipes* a Pb, en parte aérea y raíz (Malar y col., 2014).

En las raíces, se observó una disminución significativa en la concentración de MDA a las 48 hs, lo cual indica que un mecanismo enzimático antioxidante protector se activó durante las primeras horas de exposición para las concentraciones de exposición más bajas de Ni. Esto está en concordancia con el aumento de las actividades enzimáticas antioxidantes observadas. A las dos concentraciones más altas de Ni, la acumulación del metal continúa en las raíces, esto mantiene una concentración elevada de ROS, produciendo un daño oxidativo celular, que se observa por el aumento en la concentración de MDA al final del experimento.

Según los resultados obtenidos, el aumento de la concentración de pigmentos fotosintéticos y de las actividades de las enzimas antioxidantes indicaron que *E. crassipes* tiene capacidad para tolerar concentraciones moderadas de Ni.

## 12.3 Experiencia N° 3: Acumulación de Zn (II) y sus efectos sobre *Eichhornia crassipes*

### 12.3.1 Introducción

El Zn, se encuentra en aguas residuales como resultado de su uso en aleaciones, industrias textiles, funguicidas, laboratorios químicos y farmacéuticos, etc. El Zn es uno de los más importantes micronutrientes esenciales para el crecimiento vegetal (Broadley y col., 2007). Asimismo, constituye parte de las metaloenzimas y es cofactor de varias enzimas como anhidrasas, deshidrogenasas, oxidasas y peroxidasas (Hewitt, 1983). También, juega un papel importante en la regulación del metabolismo del nitrógeno, la multiplicación celular, la fotosíntesis y la síntesis de auxinas (Shier, 1994). La deficiencia de Zn ha sido reportada como un estimulante del incremento de la permeabilidad de membrana y exudación de metabolitos (Cakmak y Marschner, 1988, Cakmak, 2000), lo cual sugiere que el Zn juega un importante rol en la estabilización de membranas. Sin embargo, el Zn puede ser tóxico para las plantas cuando sobrepasa concentraciones umbrales. Un estrés por Zn puede reducir la capacidad de enraizamiento, disminuir la concentración de pigmentos fotosintéticos y causar clorosis en las hojas (Castiglione y col., 2007, Tewari y col., 2008). Se ha demostrado que el estrés por Zn aumenta la generación de ROS, causando peroxidación lipídica y alterando la actividad de muchas enzimas antioxidantes (Artetxe y col., 2002, Tripathi y col., 2004).

### 12.3.2 Metodología

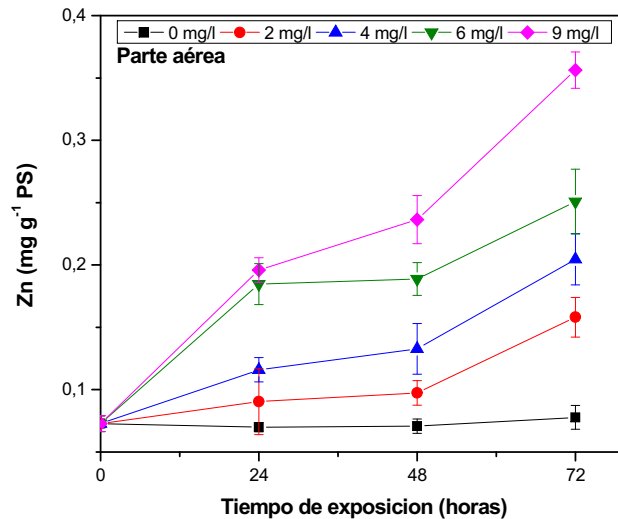
Luego de la recolección, las plantas fueron aclimatadas en el laboratorio bajo condiciones controladas, las cuales fueron explicadas y detalladas en la sección de Metodología. Dos litros de agua de red declorada y una planta (30 a 40 g de biomasa de la planta fresca) fueron dispuestos en reactores experimentales de plástico. La solución de Zn (II) (preparada usando  $ZnCl_2 \cdot 6H_2O$ , marca Merck) fue agregada para obtener concentraciones de 2, 4, 6 y 9  $mg\ l^{-1}$ . El pH del agua se mantuvo entre 7.0 y 7.2 para evitar la precipitación del metal. La duración de la exposición fue de 3 días, tomándose muestras cada 24 hs.

### 12.3.3 Resultados

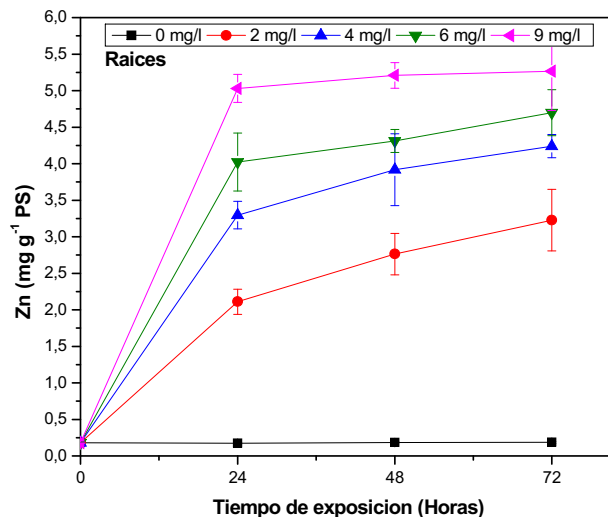
#### *Acumulación de Zn y translocación*

La concentración de Zn aumentó en partes aéreas como en raíces tanto con el aumento de la concentración de Zn en el agua como con los tiempos de exposición (**Fig. I.11 y I.12**). Las mayores concentraciones de Zn se observaron en raíz, siendo estos valores hasta 50 veces más que los

observados en la parte aérea. La mayor acumulación de Zn, se observó en las partes aéreas durante las primeras 24 y 48 hs para las dos concentraciones más altas, mientras que para las dos concentraciones más bajas, la mayor acumulación se produjo a las 72 hs. En raíces, la mayor acumulación de Zn se produjo en las primeras 24 hs para todos los tratamientos. La concentración de Zn no incrementó significativamente a lo largo del tiempo, en raíces, luego de las primeras 24 hs para las dos concentraciones más altas de Zn. De acuerdo con los FTs calculados (entre 0,03 y 0,06), el Zn no fue fácilmente translocado a las partes aéreas (**Tabla I.3**).



**Figura I.11:** Acumulación de Zn en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.



**Figura I.12:** Acumulación de Zn en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

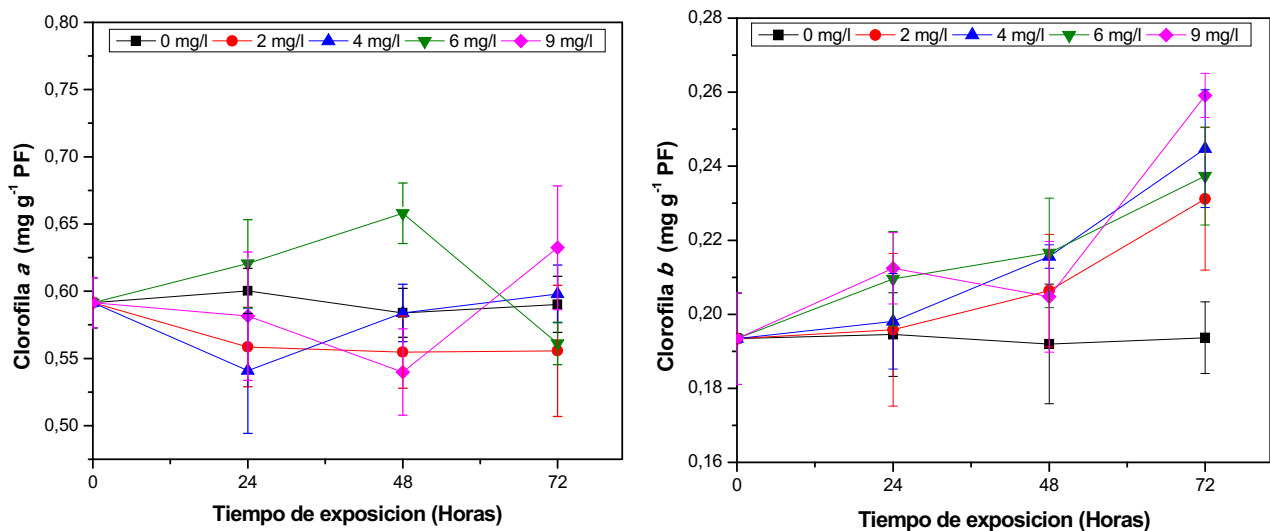


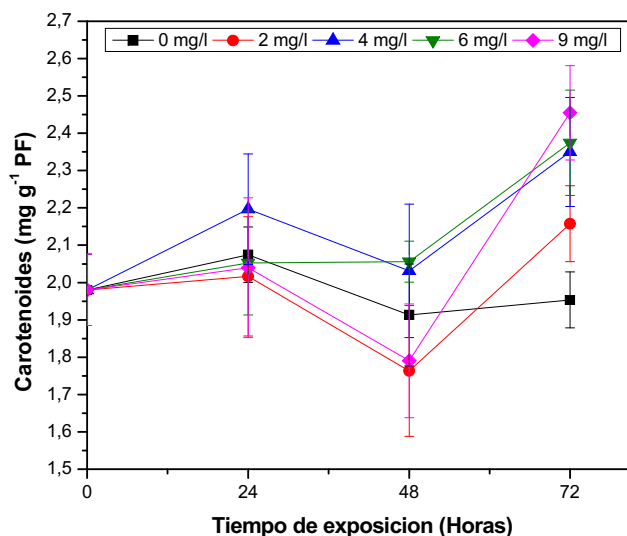
Concentración de Zn en agua (mg l <sup>-1</sup> )	Tiempo de exposición (hs)		
	24	48	72
2	0,043	0,035	0,049
4	0,035	0,034	0,048
6	0,045	0,044	0,047
9	0,039	0,045	0,067

**Tabla I.4:** Factor de Translocación por acumulación de Zn en plantas.

### *Efectos de Zn sobre pigmentos fotosintéticos*

La acumulación de Zn en las macrófitas no produjo cambios fisiológicos importantes (**Fig. I.13**). No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de Cl *a* durante los tratamientos, a excepción de la exposición de 6 mg l<sup>-1</sup> de Zn a las 48 hs. En cuanto a las concentraciones de Cl *b*, no se observaron diferencias significativas en las primeras 24 y 48 hs, respecto del control. A las 72 hs se observó un aumento significativo de las concentraciones de Cl *b* para todos los tratamientos con Zn. En cuanto a la concentración de carotenoides, no fue afectada durante las primeras 48 hs, mientras que a las 72 hs se produjo un aumento significativo de las concentraciones para todos los tratamientos, respecto del control.





**Figura I.13:** Efectos del Zn sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

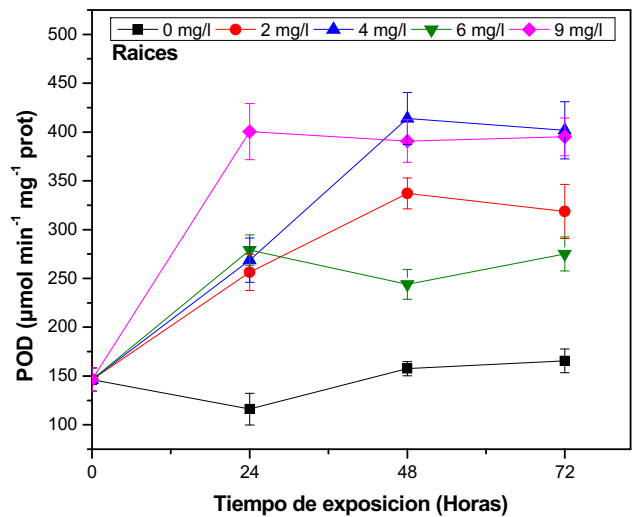
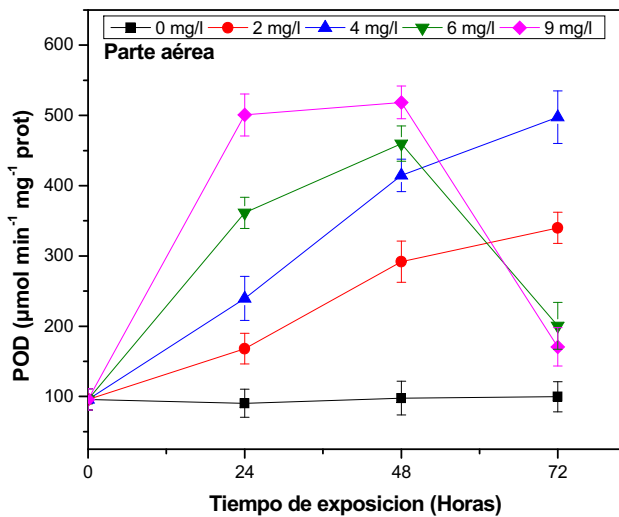
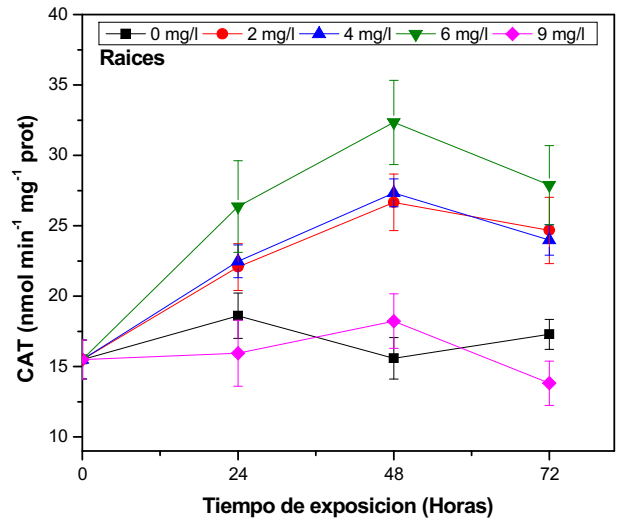
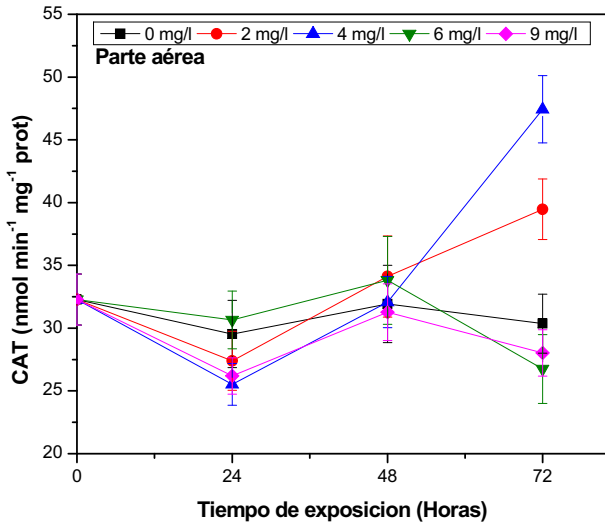
#### ***Efectos de Zn sobre la actividad de CAT, POD, SOD y GR.***

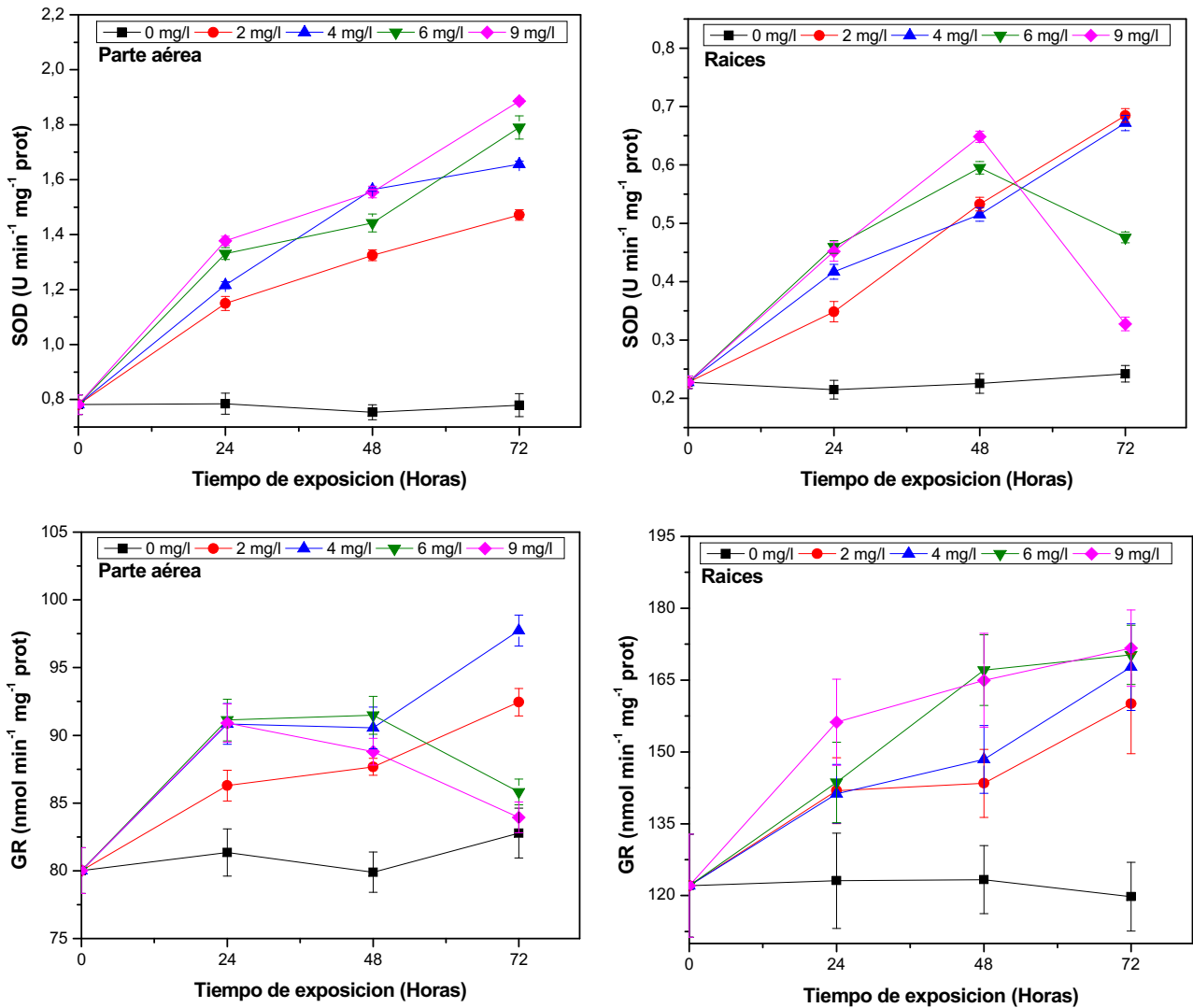
Las actividades de las enzimas antioxidantes fueron afectadas por la exposición a Zn (II) tanto en las raíces como las partes aéreas, en *E. crassipes* (**Fig. I.14**).

En partes aéreas, la actividad de la enzima CAT no presentó diferencias significativas durante las primeras 48 hs, respecto del control. Sin embargo, a las 72 hs, para las dos concentraciones más bajas de Zn, las actividades presentaron un aumento significativo, no así para las dos concentraciones más altas, donde no hubo diferencias significativas en comparación al control. Un aumento significativo en la actividad de POD se observó en todos los tratamientos con Zn y para todos los tiempos de exposición. Cabe destacar que para las dos concentraciones más altas de Zn, a las 72 hs, se observó una disminución de la actividad respecto de los tiempos anteriores. Mientras que, para las dos concentraciones más bajas de Zn, la actividad de POD continuó en aumento a lo largo del tiempo. La actividad de la enzima SOD, en parte aérea, aumentó significativamente para todas las concentraciones de Zn y tiempos de exposición estudiados. Un aumento significativo se registró en la actividad de GR durante las primeras 48 hs para todos los tratamientos, respecto del control. Mientras que, a las 72 hs, para los tratamientos con las dos concentraciones más bajas de Zn, se observó un aumento significativo de la actividad GR. Por el contrario, para los otros dos tratamientos no hubo diferencias significativas entre las actividades de GR observadas con las del control.

En raíces, la actividad CAT aumentó significativamente para los tratamientos de 2, 4 y 6 mg l<sup>-1</sup> de Zn, en los tres tiempos de exposición, mientras que presentó una disminución significativa de su actividad para el tratamiento de 9 mg l<sup>-1</sup> de Zn a las 72 hs. La actividad de POD aumentó significativamente para todas las concentraciones de Zn y tiempos de exposición, respecto del control.

En raíz, SOD tuvo un aumento significativo en su actividad para todos los tratamientos y tiempos de exposición, respecto del control. Mientras que para las dos más bajas concentraciones la actividad de SOD continuó aumentando a lo largo del tiempo, se observó que para las dos más altas concentraciones, la actividad SOD sufrió una disminución a las 72 hs, respecto de los tiempos anteriores. La actividad GR tuvo un aumento significativo, para todas las concentraciones de Zn y tiempos de exposición.



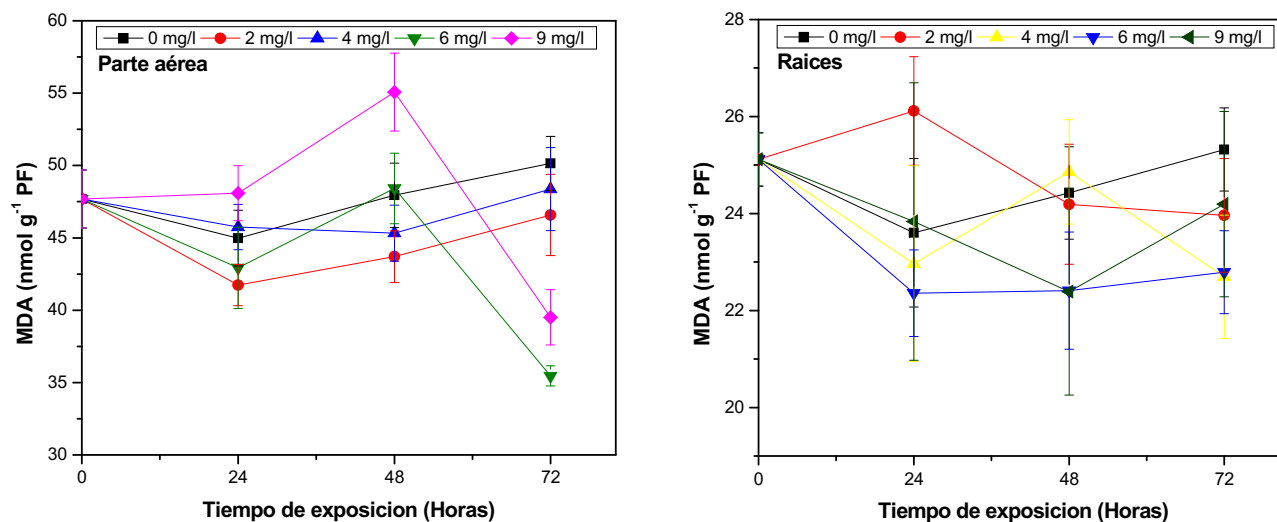


**Figura I.14:** Efectos del Zn sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en parte aérea y raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

### *Efectos de Zn sobre la peroxidación de lípidos*

Los efectos del Zn sobre la concentración de MDA se presentan en la **Fig. I.15**. En parte aérea, durante los primeros dos tiempos de exposición, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de MDA respecto del control, a excepción del tratamiento de 9 mg l<sup>-1</sup> de Zn a las 48 hs, el cual mostró un aumento significativo. Mientras que, a las 72 hs, para las dos concentraciones más altas de Zn, se observó una disminución significativa de las concentraciones de MDA. La magnitud de la reducción del MDA fue de más del 20 %.

En las raíces, la concentración de MDA no fue afectada por los tratamientos.



**Figura I.15:** Efectos del Zn sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en parte aérea y raíz.

Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

### 12.3.4 Discusión

*E. crassipes* acumuló las mayores concentraciones de Zn en raíces, siendo la translocación muy escasa, en concordancia con lo observado por otros autores (Denga y col., 2004, Miretzky y col., 2004, Hasan y col., 2007, Mishra y Tripathi, 2009, Hadad y col., 2011, Yapoga y col., 2013). La escasa translocación puede deberse a la unión del metal a las paredes celulares de la raíz (Wainwright y Woolhouse, 1977), como así también por la formación de complejos metálicos con compuestos solubles (ácidos orgánicos y aminoácidos) (Turner y Marshall, 1972) o uniéndose a proteínas específicas, contribuyendo de esta manera a la tolerancia del mismo.

En las hojas de las plantas, se ha observado que el Zn preferentemente se acumula en los cloroplastos (Van Assche y Clijsters, 1986), donde puede interactuar directamente con las membranas de los tilacoides (Szalontai y col., 1999). Esta interacción puede inhibir la síntesis de clorofilas, produciendo una reducción de la concentración de las mismas. Mishra y Tripathi (2009), observaron una disminución de la concentración de clorofilas debido a la acumulación de Zn en *E. crassipes*, luego de un período de 7 días de incubación. Hadad y col. (2011) informaron una disminución significativa de la concentración de clorofila, cuando se expuso *E. crassipes* a  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de Zn por un período de 30 días. En nuestro trabajo, las concentraciones de Zn utilizadas no afectaron las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos durante las primeras 48 hs de tratamiento. Sin embargo, es importante destacar que a las 72 hs de tratamiento, para todas las concentraciones de Zn, se observó un aumento significativo de clorofila *b* y carotenoides. Esta respuesta puede deberse a que la presencia de Zn, en la parte aérea, genera la producción de ROS, causando un estrés oxidativo, como varios estudios reportan (Madhava Rao y Sresty, 2000, Cuypers y col., 2001, Artetxe y col., 2002, Tewari y col.,

2008). Por lo tanto, considerando que los carotenoides no solo son componentes esenciales del aparato fotosintético, sino que también son protectores esenciales contra el daño fotooxidativo, actuando como eliminadores de radicales libres evitando la peroxidación de lípidos (Hou y col., 2007), es de esperarse esta respuesta. Resultados similares reportaron Wang y col. (2009), quienes observaron un aumento en la concentración de clorofila total ( $a + b$ ) en las hojas de *Hydrilla verticillata*, cuando se expuso la macrófita a 0,05 y 0,5 mg l<sup>-1</sup> de Zn, por el período de 7 días. Sin embargo, en la misma experiencia, una disminución en la concentración de clorofila total y síntomas de necrosis, se observaron en las hojas cuando se expuso la macrófita a concentraciones mayores a 10 mg l<sup>-1</sup> de Zn.

Un exceso de Zn puede generar estrés oxidativo, aumentando la producción de ROS, causando peroxidación lipídica y alterando la actividad de enzimas antioxidantes en plantas terrestres (Madhava Rao y Sresty, 2000, Cuypers y col., 2001), organismos acuáticos como algas (Li y col. 2006, Tripathi y col., 2006) y plantas acuáticas (Artetxe et al, 2002, Wang y col., 2009, Radic y col., 2010). En este contexto, el estrés oxidativo producido por el exceso de Zn incrementa la peroxidación lipídica y la permeabilidad de las membranas, disminuyendo el contenido de sulfhidrilos (Tripathi y Gaur, 2004). En nuestro experimento observamos un aumento significativo, en general, de las actividades de las enzimas antioxidantes. Yuan y col. (2009), observaron en hojas de la macrófita *Alternanthera philoxeroides*, que al ser expuesta a concentraciones de Zn (entre 0,25 y 5 mM) por el período de 5 días, las actividades de SOD y CAT aumentaron significativamente. Resultados similares también fueron observados en otra macrófita, *H. verticillata*, expuesta a concentraciones de entre 5 y 30 mg l<sup>-1</sup> de Zn, por el período de 7 días (Wang y col., 2009). También existen reportes de incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes por estrés con Zn, en plantas terrestres (Prasad y col., 1999, Tripathi y col., 2006, Tewari y col., 2008). Esto puede ser considerado como una evidencia circunstancial de un aumento de la producción de radicales libres bajo el estrés por Zn en *E. crassipes*. No obstante, el incremento observado en las actividades de las enzimas que participan del sistema antioxidante de *E. crassipes* favorecieron la tolerancia del estrés producido por Zn. Esto se vio reflejado en la peroxidación lipídica, medida como concentración de MDA, la cual no tuvo una variación significativa respecto del control en raíz, para todos los tratamientos y tiempos de exposición. En la parte aérea, las concentraciones de MDA no variaron respecto del control durante las primeras 48 hs, destacándose una disminución significativa para las dos más altas concentraciones de Zn. Esta dualidad de afectar positivamente las actividades de las enzimas antioxidantes y no producir peroxidación lipídica, permitiría concluir que el Zn es un metal con potenciales propiedades antioxidantes. En la literatura se sugiere que el Zn juega un papel importante en la protección del DNA y de las membranas del daño causado por reacción con las ROS (Cakmak, 2000). Finalmente, se ha demostrado que la presencia de Zn puede proteger a las plantas contra el estrés oxidativo inducido por

otros metales pesados (Aravind y Prasad, 2003, Aravind y Prasad, 2004, Aravind y Prasad, 2005, Aravind y col., 2009, Cherif y col., 2011, Tkalec y col., 2014)

## **CAPÍTULO II**

**Influencia de la presencia de nutrientes en la acumulación y efectos de Cr (III), Ni (II) y Zn (II) (en forma aislada) sobre**

***Eichhornia crassipes***



## 13 CAPÍTULO II

### **Influencia de la presencia de nutrientes en la acumulación y efectos de Cr (III), Ni (II) y Zn (II) (en forma aislada) sobre *Eichhornia crassipes***

#### 13.1 Introducción general

Los nutrientes y metales pesados juegan un rol muy importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Dentro de los diferentes nutrientes que necesita la planta para crecer, es ampliamente aceptado que el nitrógeno (N) y el fósforo (P) son nutrientes limitantes importantes para el crecimiento de las macrófitas y la producción primaria en los ecosistemas acuáticos (Downing, 1997, Kilhman y Hecky, 1988, Kalff, 2002). En su hábitat natural, las macrófitas usualmente son expuestas a diferentes concentraciones de metales y nutrientes. Mientras que, en los wetlands construidos para el tratamiento de aguas residuales, las condiciones a las que son expuestas las plantas son completamente diferentes, encontrándose concentraciones de metal y nutrientes usualmente más elevadas, las cuales producen efectos tóxicos sobre las mismas.

Sin embargo, se ha demostrado que el enriquecimiento con nutrientes mejora la tolerancia de las macrófitas a los metales (la mayoría de los estudios realizados a escala de laboratorio) y por lo tanto permitiría el desarrollo de la vegetación en los humedales artificiales en las concentraciones de metales que de otro modo causarían su muerte. Göthberg y col. (2004) expusieron *Ipomoea aquatica* a Hg (II), Pb (II) y Cd (II), reportando que a bajas concentraciones de nutrientes (bajos porcentajes de solución Hoagland) se observó una alta acumulación de metales y mayores efectos tóxicos inducidos por estos. Por otra parte, Hadad y col. (2007) expusieron *Salvinia herzogii* a diferentes concentraciones de Cr (III), Ni (II) y Zn (II), tanto en presencia como en ausencia de nutrientes (P y N). Concluyeron que la tasa de crecimiento relativo, la biomasa de la raíz y la concentración de clorofila fueron correlacionadas negativamente con las concentraciones de los metales (en las experiencias sin nutrientes), mientras que la adición de nutrientes atenuó estos efectos. Por otro lado, *Elodea nuttallii* e *Hydrilla verticillata* fueron expuestas a una combinación de Cd (II), Zn (II) y varias concentraciones de P por Wang y col. (2009). Sus resultados sugirieron que la interacción entre P y Cd+Zn es antagonista. La disminución en la eficiencia fotosintética y el incremento de ROS (que provocó estrés oxidativo), fueron observados en presencia de metales, mientras que el agregado de P, disminuyó parcialmente estos efectos. Mufarrege y col. (2010) evaluaron los efectos de P sobre *Pistia stratiotes* cuando es expuesta a Cr (III)

+ Ni (II) + Zn (II). La adición de P al tratamiento con combinación de metales atenuó la disminución en el crecimiento de las plantas y la longitud de las raíces, causando también un incremento significativo en las áreas de sección transversal de los vasos del metaxilema, sugiriendo que el P incrementó la tolerancia a los metales. Asimismo, en *Lemna minor* y *Spirodela polyrhiza* el agregado de nutrientes (P, N y S) suprimió y atenuó los efectos negativos sobre la tasa de crecimiento relativo y los niveles de pigmentos fotosintéticos (Leblebici y Aksoy, 2011). Sin embargo, Bian y col. (2013) evaluaron los efectos de concentraciones de N y P sobre la toxicidad de Ag (I) en *Lemna gibba*, demostrando que la macrófita fue más sensible a la plata cuando la concentración de los nutrientes fue mayor. Por lo tanto, la presencia en exceso de nutrientes, también podría ser perjudicial. Di Luca y col. (2013) evaluaron los efectos de diferentes concentraciones de P y N, en forma aislada y combinada, sobre *Pistia stratiotes* al ser expuesta a Cr (III). Concluyeron que la adición simultánea de P y N y la adición aislada de P (5 mg l<sup>-1</sup>) y N (5mg l<sup>-1</sup>) favorecen la tolerancia a Cr (III), mientras que la adición de P (10 mg l<sup>-1</sup>) y N (10 mg l<sup>-1</sup>) incrementan su toxicidad.

En cuanto a la especie en estudio (*E. crassipes*), Campanella y col. (2005) compararon en un wetland construido para tratamiento de un efluente cloacal (con concentración media de P de 5 mg l<sup>-1</sup>), la morfología de esta especie en la entrada y salida del humedal, durante el período de 3 meses. Informaron que las plantas se desarrollaron más, en especial la parte aérea, a la entrada del humedal, donde la concentración de P era mayor. Por otra parte, las plantas que se encontraban a la salida del wetland desarrollaron mucho más, el largo de sus raíces. El mismo estudio reportó un incremento en el número de los vasos y en el área de la sección transversal de las raíces y vasos del metaxilema de las plantas que crecen en la entrada del wetland. En otro estudio, llevado a cabo por Hadad y col. (2009), se evaluó los efectos morfológicos sobre *E. crassipes* expuesta a Ni (II) y P, durante un período de 30 días. La longitud media de la raíz, el número de hojas, la biomasa y la concentración de clorofila fue afectada negativamente por la exposición al Ni (II), mientras que estos parámetros incrementaron significativamente por la exposición al P, en comparación al control. Sin embargo, no existen registros de investigaciones que se hayan llevado a cabo para estudiar los efectos de la presencia de nutrientes en *E. crassipes* cuando es expuesta a metales pesados, en especial, sobre parámetros de estrés oxidativo.

### **13.2 Experiencia N° 1: Influencia de la presencia de nutrientes en la acumulación y efectos de Cr (III) sobre *Eichhornia crassipes***

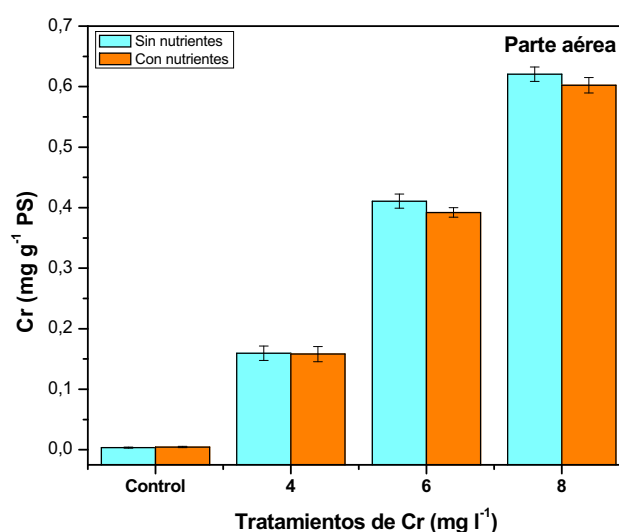
### 13.2.1 Metodología

Las plantas recolectadas fueron aclimatadas en el laboratorio bajo condiciones controladas, explicadas en la sección de Metodología. Dos litros de agua de red y una planta (30 a 40 g de biomasa de planta fresca) fueron dispuestos en reactores experimentales de plástico. Una solución de Cr (III) (preparada usando  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) fue agregada para obtener concentraciones de 4, 6 y 8  $\text{mg l}^{-1}$  finales. En forma paralela se realizaron otros tratamientos, con las mismas concentraciones de Cr (III) pero con el agregado de nutrientes: 5  $\text{mg l}^{-1}$  de P y 15  $\text{mg l}^{-1}$  de N (concentraciones de nutrientes usuales encontradas en los efluentes de los wetlands construidos). El pH del agua se mantuvo entre 5,5 y 6,5 (se usó HCl ó Na (OH)) para evitar la precipitación del metal. La duración de la exposición fue de 5 días, tomándose las muestras al finalizar la experiencia.

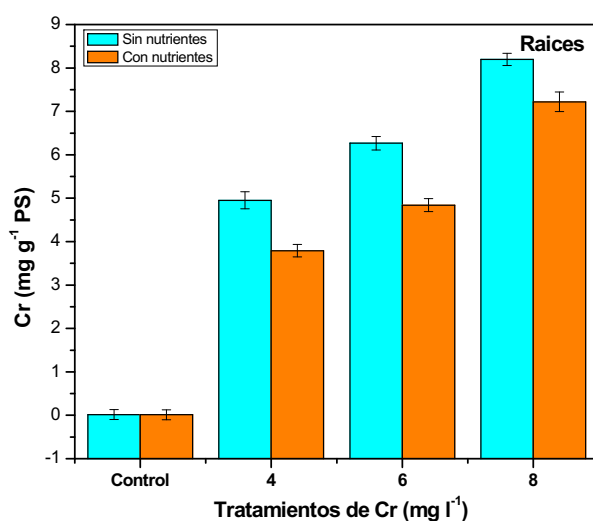
### 13.2.2 Resultados

#### Acumulación de Cr

En las **Fig. II.1 y II.2**, se observa un aumento significativo en la concentración de Cr en partes aéreas y raíces con el aumento de la concentración de Cr en la solución, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes. Las mayores concentraciones de Cr se determinaron en las raíces (**Fig. II.2**), con concentraciones hasta 15 veces más. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones finales del metal, en la parte aérea, entre los mismos tratamientos de Cr, en presencia y ausencia de nutrientes. Mientras que en raíces, la presencia de nutrientes provocó una disminución significativa (entre el 11,89 y 23,43 %) de la concentración del metal en comparación con los tratamientos donde no se adicionó nutrientes.



**Figura II.1:** Acumulación de Cr en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Cr, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.



**Figura II.2:** Acumulación de Cr en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Cr, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

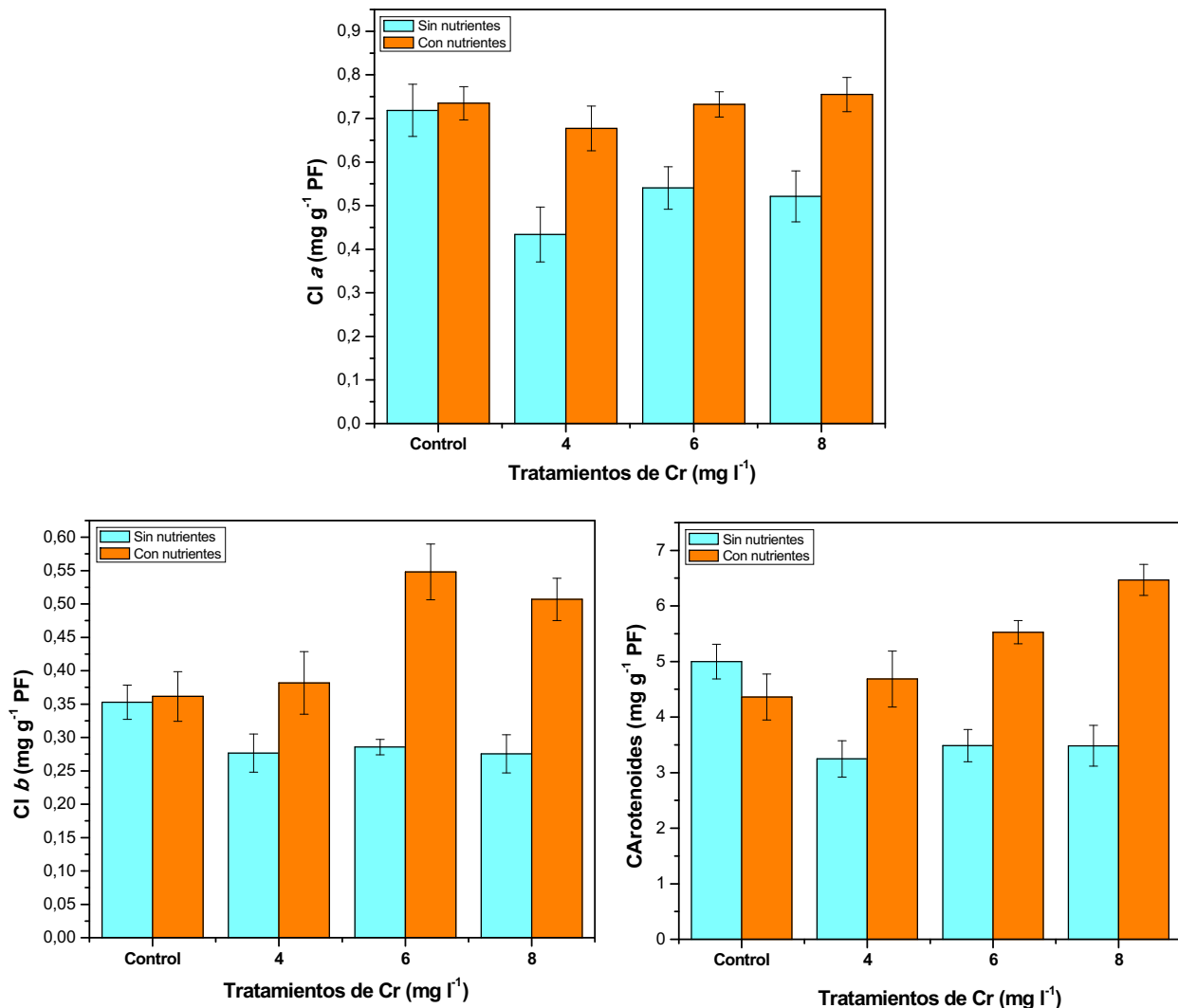
### ***Efectos sobre pigmentos fotosintéticos***

La acumulación de Cr en las macrófitas produjo cambios fisiológicos significativos (**Fig. II.3**), tanto en presencia como en ausencia de nutrientes.

No hubo diferencias significativas entre el control con y sin nutrientes, para ningunos de los pigmentos fotosintéticos. Todos los tratamientos de Cr en ausencia de nutrientes produjeron una disminución significativa de la concentración de Cl *a* y *b*, como también de los carotenoides, respecto del control. Se observaron disminuciones, respecto del control, de hasta un 39,64 % para Cl *a*, 21,95 % para Cl *b* y de hasta un 35,02 % para las concentraciones de carotenoides, en los tratamientos en ausencia de nutrientes. Sin embargo, estas disminuciones no tuvieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de Cr, en ausencia de nutrientes.

La presencia de nutrientes afectó significativamente la concentración de los pigmentos fotosintéticos. En Cl *a* no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con nutrientes y el control, pero sí existió una diferencia significativa cuando se comparó con los tratamientos de Cr en ausencia de nutrientes. Hubo aumento en la concentración de Cl *a* de un 35,46 a un 56,07 %, en los tratamientos con nutrientes, comparados con aquellos en ausencia de los mismos. En la concentración de Cl *b* se observó una diferencia significativa solo para los tratamientos con las dos mayores concentraciones de Cr en presencia de nutrientes, comparados con el control, con un aumento de más del 40 %. Mientras que, la concentración de Cl *b* aumentó significativamente en un 37,97 a 91,93 % en los tratamientos con nutrientes comparados con aquellos tratamientos de Cr en ausencia de los mismos. En cuanto a la concentración de carotenoides, solo los tratamientos con las dos mayores concentraciones de Cr, en presencia de nutrientes, tuvieron diferencias significativas con el control,

con un aumento de más del 58 %. Al comparar la concentración de carotenoides en los tratamientos con nutrientes con aquellos donde no se agregaron, se observó un aumento significativo. Estos aumentos variaron entre 44,26 y 85,71 %.



**Figura II.3:** Efectos de diferentes concentraciones de Cr sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*, en presencia y ausencia de nutrientes.

Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

#### ***Efectos sobre la actividad de CAT, POD, SOD y GR.***

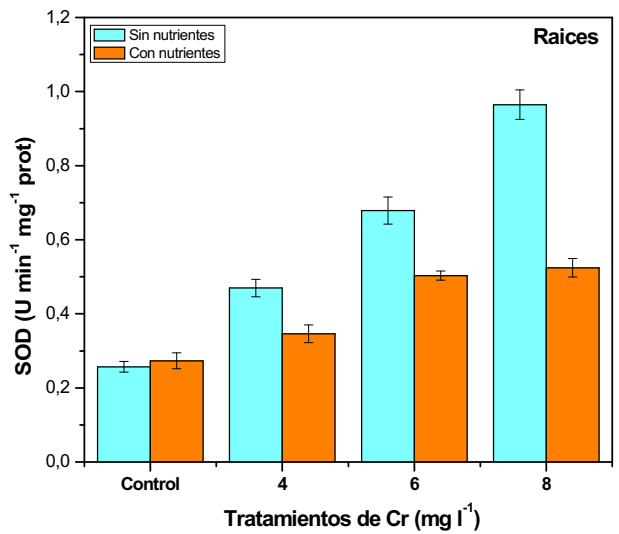
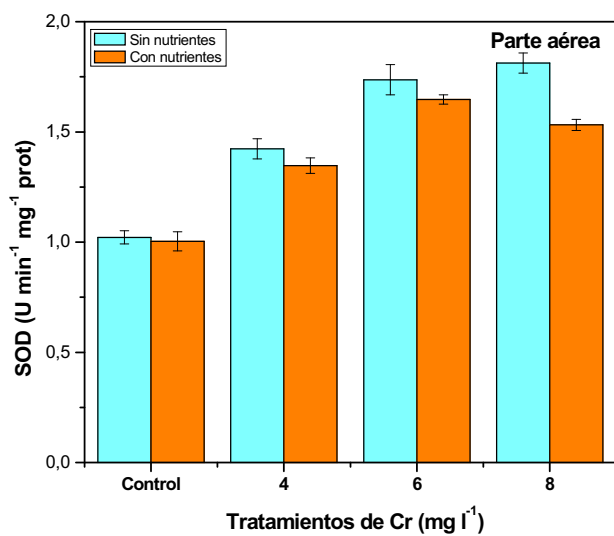
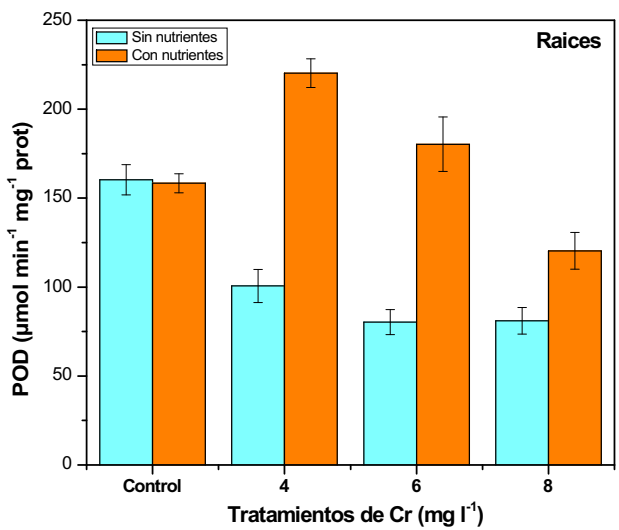
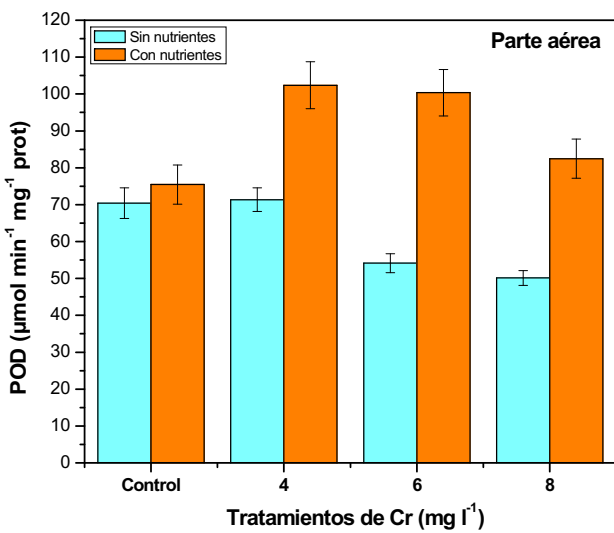
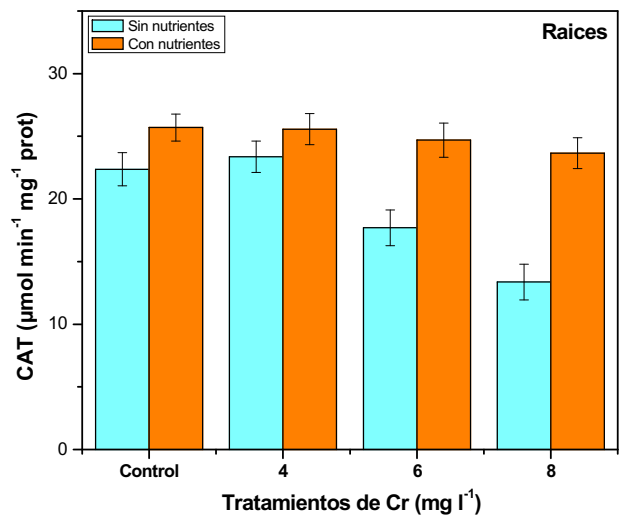
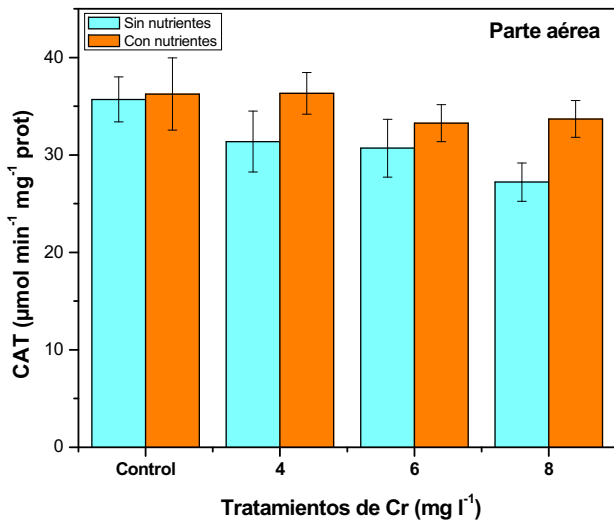
Las actividades de las enzimas antioxidantes en *E. crassipes*, fueron afectadas por la exposición a Cr en todo el tejido vegetal, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes (**Fig. II.4**).

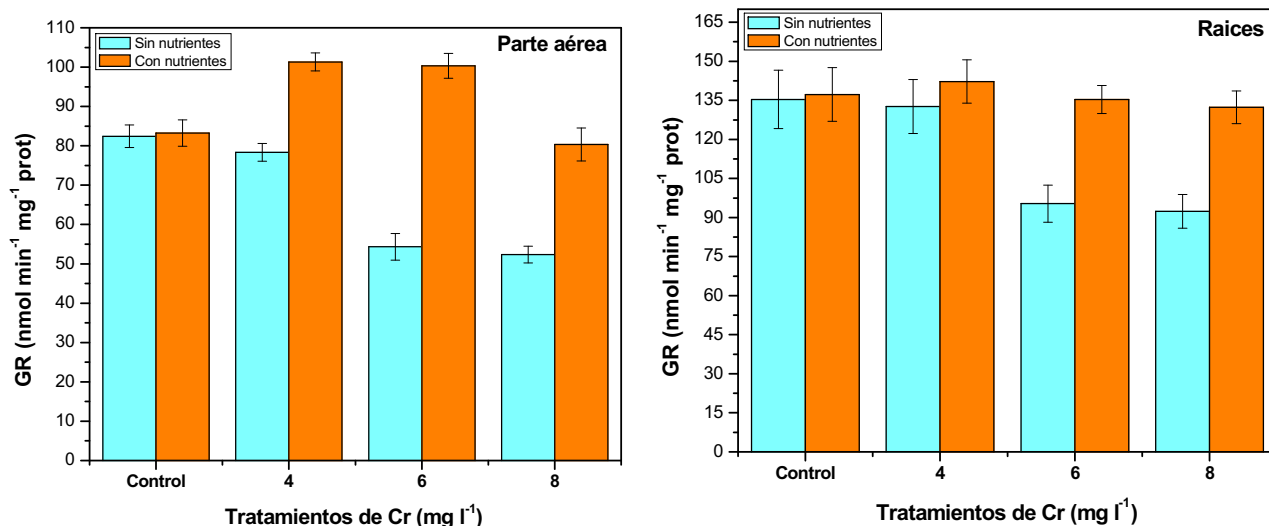
En parte aérea, solo el tratamiento de 8 mg l<sup>-1</sup> de Cr afectó significativamente disminuyendo la actividad de CAT comparado con el control. Mientras que la presencia de nutrientes no afectó significativamente las actividades de CAT respecto del control. En cuanto a la diferencia entre los tratamientos con y sin nutrientes, solo se observó un aumento significativo de la actividad de CAT (23,83%) en el tratamiento de 8 mg l<sup>-1</sup> de Cr. Se observó una disminución significativa de las

actividades de POD, cuando se expuso *E. crassipes* a 6 y 8 mg l<sup>-1</sup> de Cr, comparando con el control. La presencia de nutrientes incrementó significativamente las actividades de POD, para las dos más bajas concentraciones de Cr, comparado con el control. En los tratamientos con nutrientes se vio incrementada significativamente la actividad de POD (entre 43,48 y 85,37 %). La actividad de la enzima SOD, en parte aérea incrementó significativamente, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes para todos los tratamientos de Cr, respecto de los controles. Es de destacar que las actividades de SOD aumentaron significativamente con el aumento de la concentración de Cr en solución, para los tratamientos en ausencia de nutrientes. Estos aumentos variaron entre un 34,21 a 77,45 %, en función de cada control. Al comparar los tratamientos de Cr con y sin nutrientes, solo se observó una diferencia en el tratamiento de 8 mg l<sup>-1</sup>, presentando una disminución significativa del 15,49 %. Los tratamientos con las dos mayores concentraciones de Cr, produjeron una disminución significativa de las actividades de GR, respecto del control. Por otra parte, los tratamientos con las dos menores concentraciones de Cr, pero en presencia de nutrientes, produjeron un aumento significativo de la actividad de GR, respecto al control. Al comparar los tratamientos de Cr con y sin nutrientes, se observó un aumento significativo de las actividades de GR, en los tratamientos con nutrientes, que variaron entre 29,37 y 84,67 %.

En raíces, la exposición a las dos mayores concentraciones de Cr produjo en *E. crassipes* una disminución significativa de la actividad de CAT, respecto del control. Para los tratamientos con nutrientes, las actividades de CAT no tuvieron diferencias significativas respecto del control. Al comparar los tratamientos de Cr con y sin nutrientes, solo se observó diferencias significativas en las actividades de CAT, para las dos mayores concentraciones de Cr. Las actividades de POD, en raíz, disminuyeron significativamente (entre un 37,22 y 49,88 %) para todos los tratamientos de Cr sin nutrientes, respecto del control. Solo los tratamientos con las dos menores concentraciones de Cr, en presencia de nutrientes, presentaron un aumento significativo respecto del control. Al comparar los tratamientos con y sin nutrientes, se observó que la presencia de nutrientes provoca un aumento significativo de las actividades de POD, desde 48,5 a 124,42 %. Es de destacar que una disminución significativa en las actividades de POD se observó en los tratamientos con nutrientes, al aumentar la concentración de Cr en solución. Las actividades de SOD, en raíz, aumentaron significativamente para todos los tratamientos de Cr, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, respecto a sus controles. Los tratamientos donde hubo presencia de nutrientes presentaron actividades de SOD significativamente menores (del 25,89 a 45,63 %) a los tratamientos donde había ausencia de nutrientes. La actividad de GR solo se vio disminuida significativamente para los dos tratamientos de mayor concentración de Cr, en ausencia de nutrientes, respecto del control. Las actividades de GR en los tratamientos con nutrientes no presentaron diferencias significativas respecto de su control. Sin

embargo, se observó que para las dos concentraciones mayores de Cr en solución, la presencia de nutrientes incrementó significativamente la actividad de GR (un promedio del 42 %), en comparación a los tratamientos sin nutrientes.





**Figura II.4:** Efectos del Cr sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

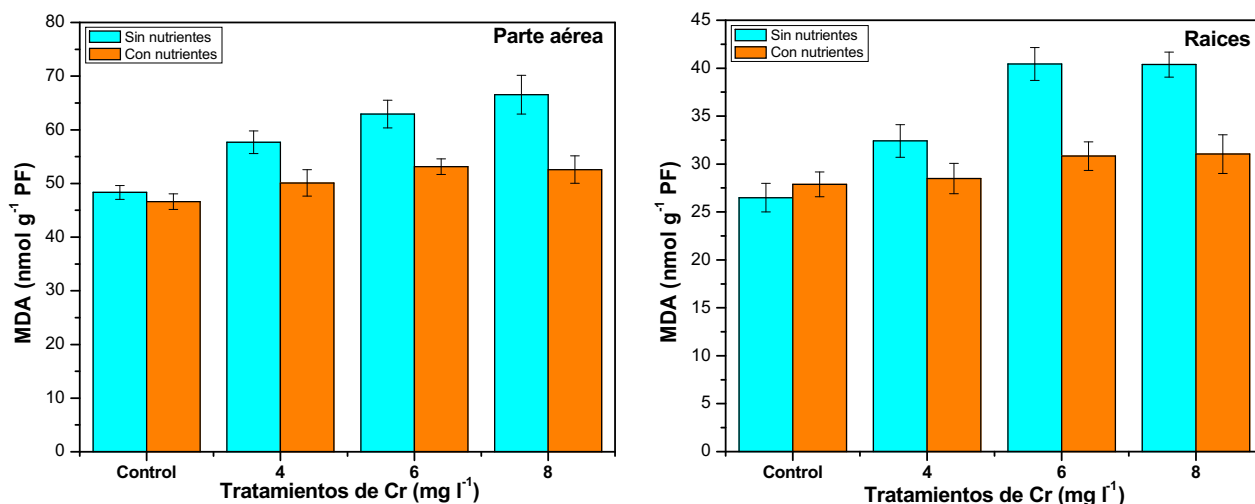
### *Efectos sobre la peroxidación de lípidos*

Los efectos del Cr sobre la concentración de MDA se presentan en la **Fig. II.5**, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes.

En parte aérea, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de MDA entre los controles con y sin nutrientes. Se observó un aumento significativo de las concentraciones de MDA, para todos los tratamientos de Cr (sin nutrientes), respecto del control. Estos aumentos variaron entre un 19,36 y un 37,70 %. Por el contrario, en presencia de nutrientes las concentraciones de MDA aumentaron significativamente solo para los tratamientos de 6 y 8 mg l<sup>-1</sup> de Cr, respecto del control. Al comparar los tratamientos de Cr, con y sin nutrientes, se observó una disminución significativa de las concentraciones de MDA, entre un 13,14 y 20,98 %.

En las raíces, no existieron diferencias significativas entre los controles con y sin nutrientes. Los tratamientos de Cr sin nutrientes presentaron un aumento significativo de las concentraciones de MDA, entre un 22,32 y 52,41 % respecto del control. Solo los tratamientos de 6 y 8 mg l<sup>-1</sup> de Cr, con agregado de nutrientes, aumentaron significativamente respecto del control. Sin embargo, al comparar los tratamientos con y sin nutrientes, observamos que la adición de nutrientes produce una disminución significativa (entre 12,09 y 23,77 %) en las concentraciones de MDA para cada tratamiento.





**Figura II.5:** Efectos del Cr sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

### 13.2.3 Consideraciones finales de la experiencia N° 1

*E. crassipes* acumuló Cr en sus raíces, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, pero en presencia de nutrientes las concentraciones fueron significativamente menores. Se observó que en parte aérea no hubo diferencias significativas en las concentraciones de Cr tanto para los tratamientos en presencia o ausencia de nutrientes.

En cuanto al sistema fotosintético, la presencia de nutrientes favoreció de alguna manera el sostenimiento o continuidad de la actividad fotosintética, ya que las concentraciones de clorofila como de carotenoides fueron mayores en los tratamientos con nutrientes respecto de los tratamientos solo con el metal. Dichas concentraciones se mantuvieron con valores cercanos al control o aumentaron por encima de él.

Por otro lado, la presencia de nutrientes favoreció la respuesta enzimática antioxidante ante el estrés producido por el Cr, aumentando significativamente las actividades de POD (en parte aérea como en raíz). La actividad de GR, en parte aérea, también se vio favorecida en los tratamientos de Cr con nutrientes, pero solo para las dos concentraciones más bajas de Cr. Las demás enzimas, si bien incrementaron su actividad en presencia de nutrientes, al compararlas con los tratamientos sin nutrientes, no tuvieron diferencias significativas respecto de los controles.

En los tratamientos de Cr sin nutrientes existió daño oxidativo debido a que se observó un aumento en las concentraciones de MDA, tanto en parte aérea como en raíz. En los tratamientos con nutrientes, se pudo observar una disminución significativa de las concentraciones de MDA, respecto de los tratamientos sin nutrientes. Sin embargo en los tratamientos de 6 y 8 mg l<sup>-1</sup> de Cr, tanto en parte aérea como en raíz, aún en presencia de nutrientes, se observó un aumento significativo de las

concentraciones de MDA respecto del control, permitiendo concluir la existencia de peroxidación lipídica.

### **13.3 Experiencia N° 2: Influencia de la presencia de nutrientes en la acumulación y efectos de Ni (II) sobre *Eichhornia crassipes***

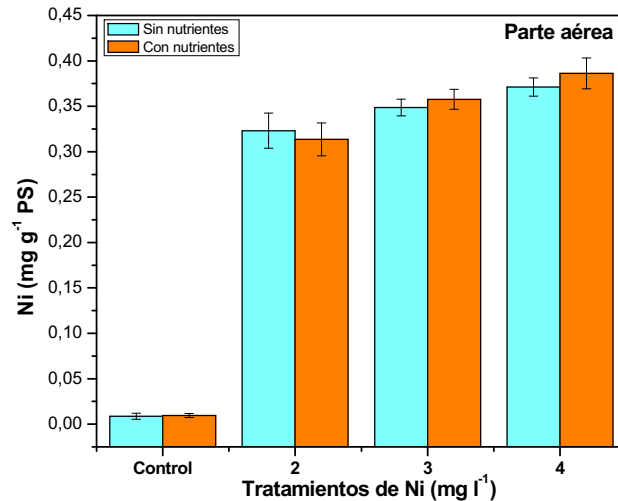
#### **13.3.1 Metodología**

Las plantas recolectadas fueron aclimatadas en el laboratorio bajo condiciones controladas, explicadas en la sección de Metodología. Dos litros de agua de red y una planta (30 a 40 g de biomasa de planta fresca) fueron dispuestos en reactores experimentales de plástico. Una solución de Ni (II) (preparada usando  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) fue agregada para obtener concentraciones de 2, 3 y 4  $\text{mg l}^{-1}$  finales. En forma paralela se realizaron otros tratamientos, con las mismas concentraciones de Cr (III) pero con el agregado de nutrientes: 5  $\text{mg l}^{-1}$  de P y 15  $\text{mg l}^{-1}$  de N. El pH del agua se mantuvo entre 6,3 y 6,5 (se usó HCl ó Na (OH)) para evitar la precipitación del metal. La duración de la exposición fue de 5 días, tomándose las muestras al finalizar la experiencia.

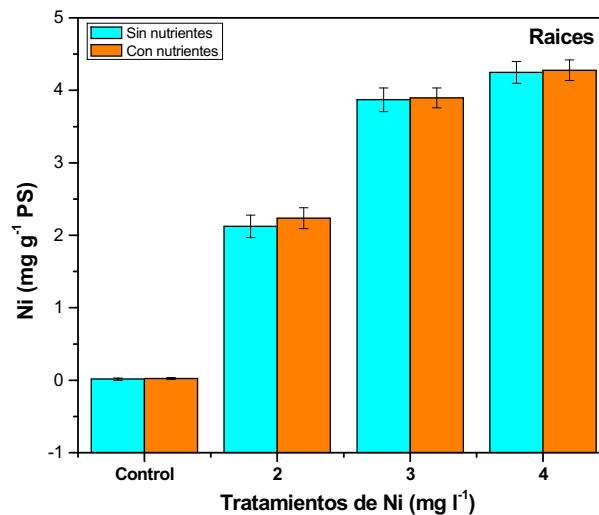
#### **13.3.2 Resultados**

##### ***Acumulación de Ni***

Se observó un aumento significativo en las concentraciones de Ni, tanto en parte aérea como en raíz, con el aumento en la concentración de Ni en solución, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes (**Fig. II.6 y II.7**). Las mayores concentraciones de Ni se determinaron en las raíces (**Fig. II.7**), con concentraciones hasta 10 veces más que las de la parte aérea. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones finales del metal, en la parte aérea y raíz, entre los mismos tratamientos de Cr, en presencia y ausencia de nutrientes.



**Figura II.6:** Acumulación de Ni en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Ni, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.



**Figura II.7:** Acumulación de Ni en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Ni, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

### ***Efectos sobre pigmentos fotosintéticos***

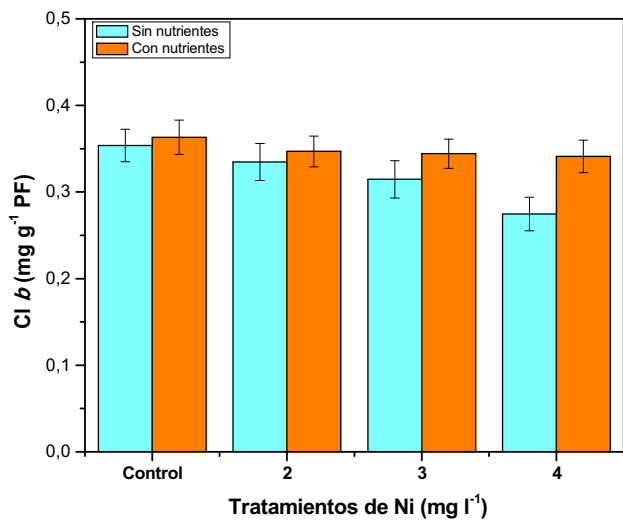
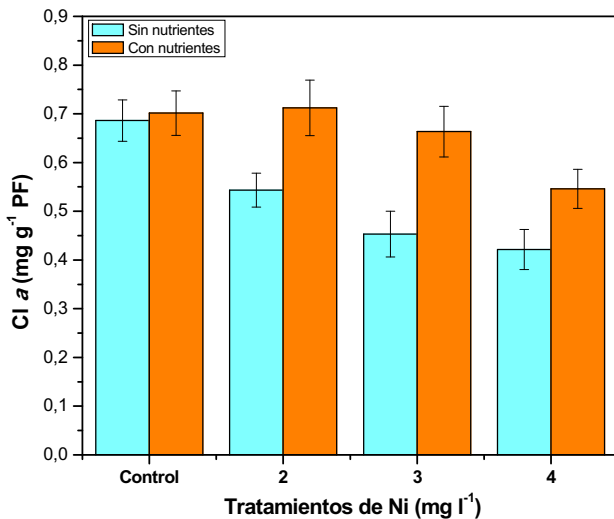
Se observaron cambios fisiológicos significativos por la acumulación de Ni, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes (**Fig. II.8**).

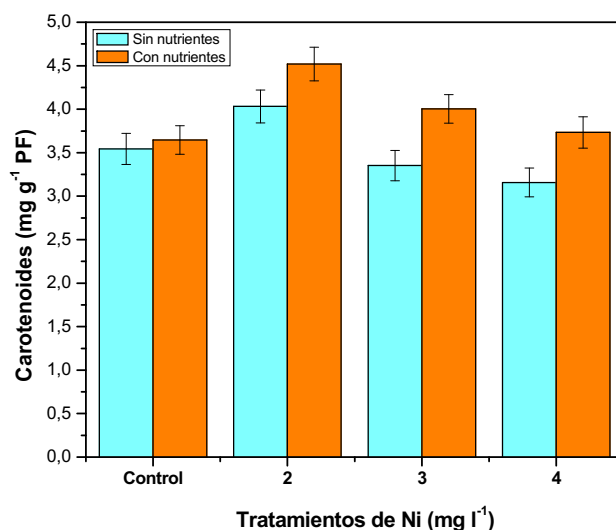
No se observaron diferencias significativas entre el control con y sin nutrientes, para ninguno de los pigmentos fotosintéticos. En ausencia de nutrientes, se observó una disminución significativa de la concentración de Cl *a* en todos los tratamientos con Ni, respecto del control. Dichas disminuciones en las concentraciones de Cl *a*, variaron entre un 20,82 y un 38,59 %. Por otra parte, en presencia de nutrientes, solo el tratamiento de 4 mg l<sup>-1</sup> de Ni, presentó una disminución significativa (del 22,17%) en la concentración de Cl *a* respecto del control. Al comparar los tratamientos de Ni, con y sin nutrientes, se observó que en presencia de nutrientes hay una mayor concentración de Cl *a*. Estas

diferencias, estadísticamente significativas, van entre un 29,59 y 46,42 %, respecto de los tratamientos sin nutrientes.

La concentración de Cl *b* solo fue afectada en el tratamiento de 4 mg l<sup>-1</sup> de Ni, en ausencia de nutrientes, observándose una disminución significativa de un 22,33 %, respecto del control. En los tratamientos de Ni, en presencia de nutrientes, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de Cl *b* respecto del control. Solo se observó una diferencia significativa en la concentración de Cl *b*, entre los tratamientos de 4 mg l<sup>-1</sup> de Ni, con y sin nutrientes, siendo 24,19 % mayor la concentración en el tratamiento con nutriente.

La concentración de carotenoides fue afectada significativamente en los tratamientos de 2 y 4 mg l<sup>-1</sup> de Ni, sin nutrientes, con un aumento y disminución, respectivamente, al compararse con el control. En los tratamientos de Ni en presencia de nutrientes, se observó un aumento en la concentración de carotenoides para las dos más bajas concentraciones de Ni, respecto del control. Al comparar los tratamientos de Ni, con y sin nutrientes, se observó que la presencia de nutrientes favoreció significativamente el aumento en la producción de carotenoides.





**Figura II.8:** Efectos de diferentes concentraciones de Ni sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

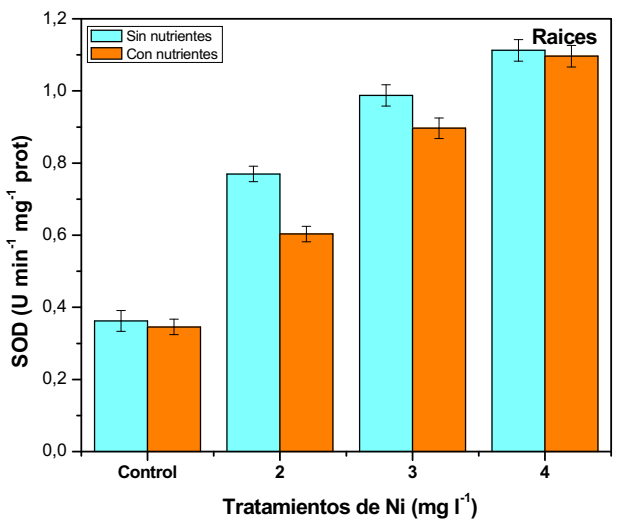
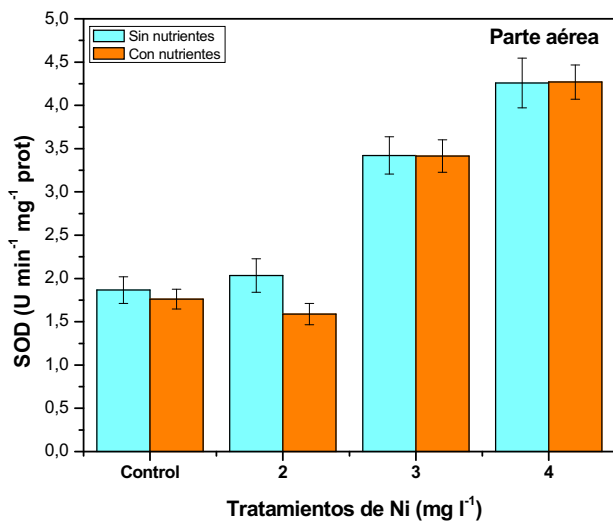
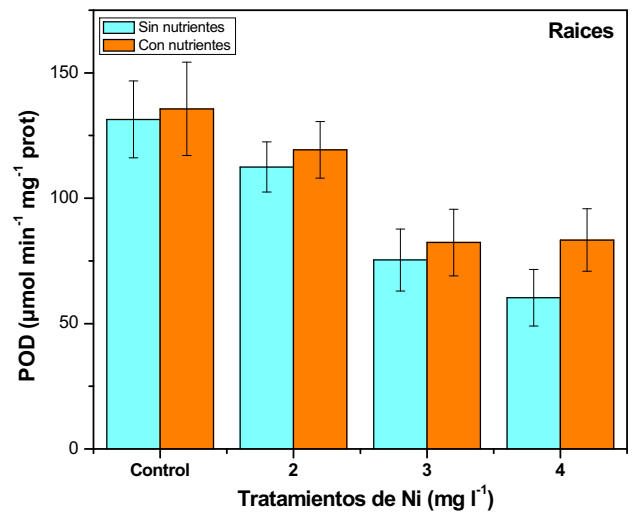
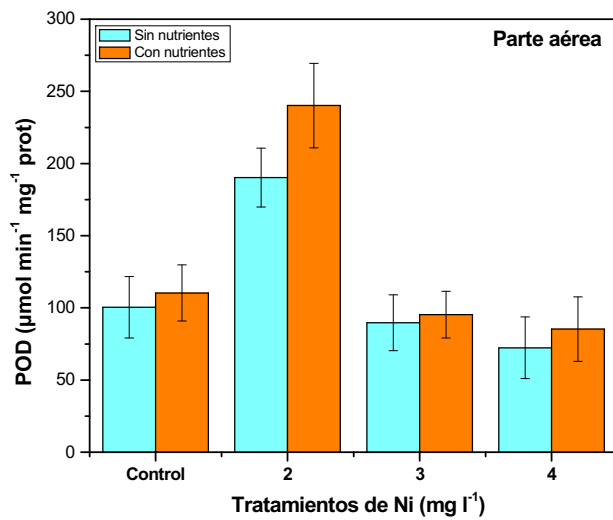
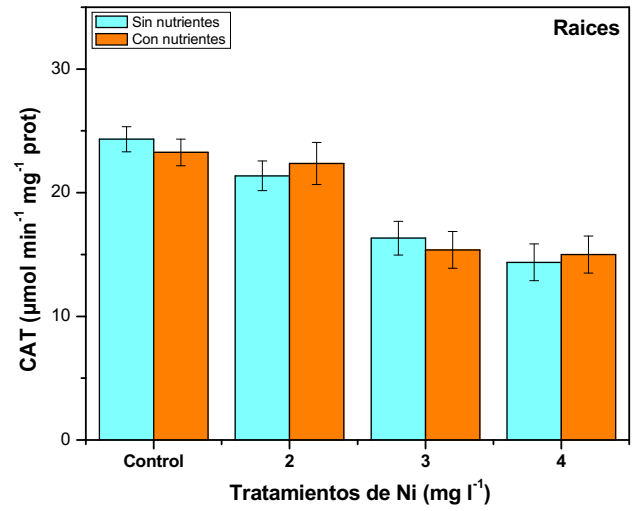
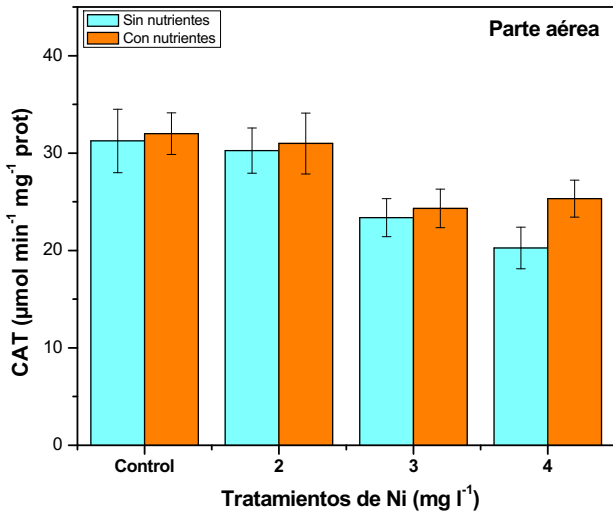
#### ***Efectos sobre la actividad de CAT, POD, SOD y GR.***

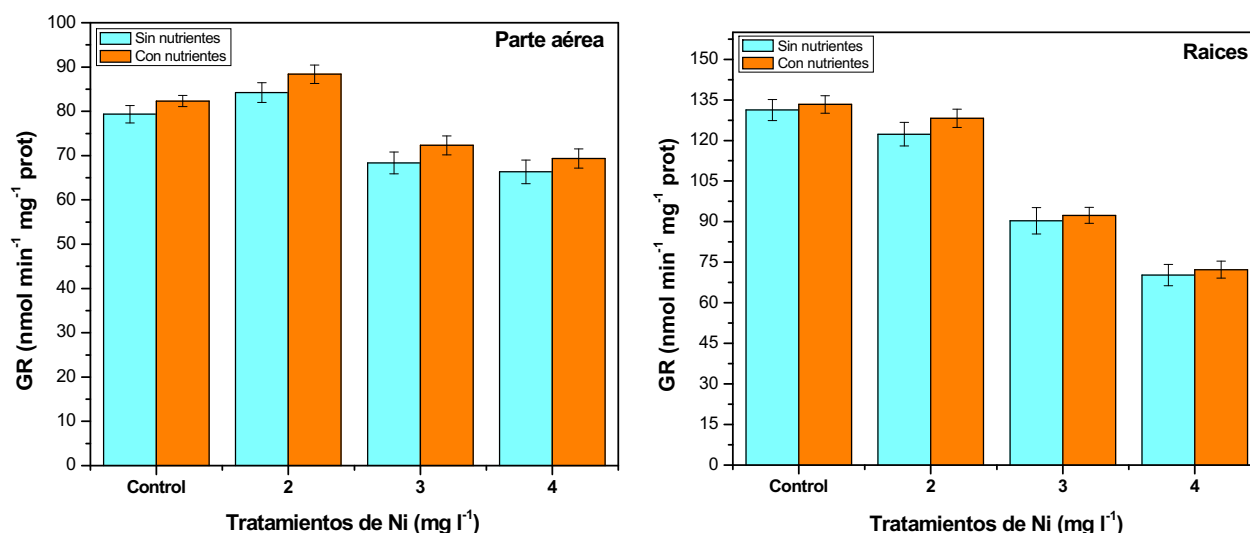
Las actividades de las enzimas antioxidantes en *E. crassipes*, fueron afectadas por la exposición a Ni (III) en todo el tejido vegetal, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes (**Fig. II.9**).

En parte aérea, los tratamientos con las dos mayores concentraciones de Ni, en ausencia de nutrientes, disminuyeron significativamente la actividad de CAT, entre un 25,20 y 35,17 % respecto del control. Los mismos tratamientos (6 y 8 mg l<sup>-1</sup> de Ni) pero en presencia de nutrientes, también presentaron una disminución significativa (entre 23,98 y 20,86 %) en la actividad de CAT, respecto del control. Al comparar las actividades de CAT, entre los tratamientos de Ni, con y sin nutrientes, solo en el tratamientos de 8 mg l<sup>-1</sup> de Ni existe una diferencia significativa, siendo mayor la actividad de CAT (24,97 %) en el tratamiento con nutrientes. La actividad de la enzima POD, en la parte aérea, solo se vio afectada para el tratamiento con 2 mg l<sup>-1</sup> de Ni, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes. Un incremento significativo del 89,50 % y del 117,68% se observó en la actividad de POD, para el tratamiento de menor concentración de Ni, en ausencia y presencia de nutrientes, respectivamente. Los demás tratamientos no tuvieron diferencias significativas, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, respecto de los controles. Se observó un incremento significativo en la actividad de SOD respecto de los controles, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, para las dos mayores concentraciones de Ni a la que fue expuesta *E. crassipes*. Sin embargo, dichos aumentos (entre 83,37 y 142,21 %) no tuvieron diferencias significativas al ser comparados entre tratamientos. La actividad de GR tuvo un aumento significativo, en parte aérea, para el tratamiento de 2 mg l<sup>-1</sup> de Ni, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, respecto de los controles. Sin embargo, para los dos tratamientos con mayor concentración de Ni, se observó una disminución

significativa de la actividades de GR (entre el 12,16 y 16,39 %), tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, respecto de los controles.

En raíces, todos los tratamientos con Ni, en ausencia de nutrientes, produjeron una disminución significativa de la actividad de CAT (entre el 12,16 y 40,93 %) respecto del control. Mientras que en presencia de nutrientes, solo los tratamientos con las dos mayores concentraciones de Ni produjeron una disminución significativa de la actividad de CAT (entre el 33,92 y 35,56 %), respecto del control. No se observaron diferencias significativas en las actividades de CAT, entre los tratamientos con y sin nutrientes. Al igual que las respuestas observadas en la actividad de la enzima CAT, POD presentó una disminución significativa de la actividad (entre 38,57 y 54,11 %) para los tratamientos de 3 y 4 mg l<sup>-1</sup> de Ni, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, respecto de los controles. No se observaron diferencias significativas en las actividades entre los tratamientos con y sin nutrientes. Todos los tratamientos de Ni, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, presentaron un aumento significativo de la actividad de SOD (entre 74,50 y 217,17 %) respecto de los controles. Se observó que la actividad de SOD, en raíz, aumentó con el aumento de la concentración de Ni en solución. La presencia de nutrientes disminuyó significativamente la actividad de SOD en los tratamientos de 2 y 3 mg l<sup>-1</sup> de Ni. La actividad de GR disminuyó significativamente en todos los tratamientos de Ni, en ausencia de nutrientes, respecto del control. Solo para los tratamientos de 3 y 4 mg l<sup>-1</sup> de Ni, en presencia de nutrientes, se observó una disminución significativa (entre el 30,75 y 45,82 %) de la actividad de GR, respecto del control. No se observaron diferencias significativas en las actividades de SOD entre tratamientos de Ni con y sin nutrientes.





**Figura II.9:** Efectos del Ni sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

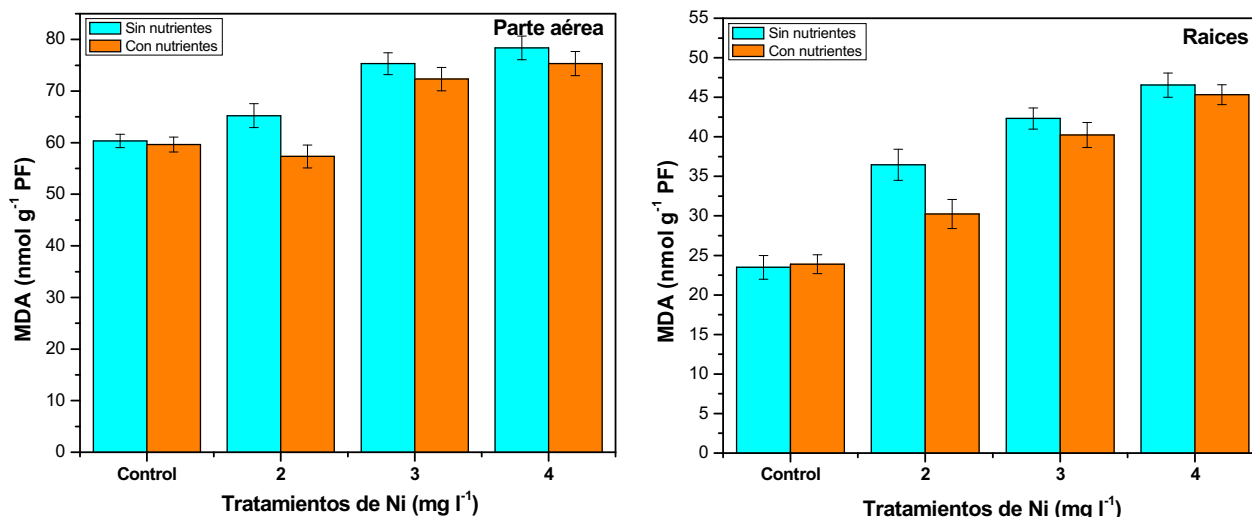
### *Efectos sobre la peroxidación de lípidos*

Los efectos del Ni, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, sobre la concentración de MDA se presentan en la **Fig. II.10**.

En parte aérea, en ausencia de nutrientes, se observó un aumento significativo de la concentración de MDA para todos los tratamientos de Ni, en ausencia de nutrientes, respecto del control. Por el contrario, en presencia de nutrientes, solo en los tratamientos con 3 y 4 mg l<sup>-1</sup> de Ni, se observó un aumento significativo de la concentración de MDA, respecto del control, pero sin diferencia significativa respecto del tratamiento paralelo sin nutrientes. En el tratamiento de 2 mg l<sup>-1</sup> de Ni se observa una disminución significativa en la concentración de MDA al agregar nutrientes en la solución, pero sin diferencia significativa respecto del control.

En las raíces, se observó un aumento significativo en todos los tratamientos de Ni, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, respecto de los controles. Dichos aumentos, en ausencia de nutrientes variaron entre 55,21 y 98,07 % y en presencia de nutrientes, entre un 26,69 y 89,81 %. No se encontraron diferencias significativas entre los mismos tratamientos de Ni, con y sin nutrientes, excepto para la concentración de 2 mg l<sup>-1</sup> de Ni, donde disminuyó significativamente un 17,06 % la concentración de MDA en presencia de nutriente.





**Figura II.10:** Efectos del Ni sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

### 13.3.3 Consideraciones finales de la experiencia N° 2

*E. crassipes* tuvo la capacidad de acumular Ni en todo el tejido vegetal, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes. No existió diferencia significativa, entre las concentraciones de Ni encontradas en los tejidos, al agregar nutrientes al medio. La sorción de Ni no fue afectada por la presencia de nutrientes en solución.

La exposición de *E. crassipes* a las tres concentraciones de Ni, produjo en 5 días una disminución significativa de la concentración de clorofila *a*. Solo la exposición a la concentración mayor de Ni (4 mg l<sup>-1</sup>) produjo una disminución significativa en la concentración de clorofila *b*. Mientras que el tratamiento con la menor concentración de Ni produjo un aumento significativo de la concentración de carotenoides, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, los demás no tuvieron efectos significativos. El Ni afectó negativamente el proceso fotosintético al disminuir la concentración de clorofila, probablemente debido al estrés oxidativo observado en el aumento de la concentración de MDA en parte aérea. Sin embargo, la presencia de nutrientes en el medio ayudó a mantener la actividad fotosintética, solo para las concentraciones menores, donde también se observó un aumento de la concentración de carotenoides. Estos últimos tienen un carácter antioxidante, lo cual indicaría la presencia de ROS y por consiguiente un estrés oxidativo moderado.

En cuanto a la respuesta enzimática antioxidante en *E. crassipes*, los tratamientos con Ni produjeron un incremento y disminución de las actividades de las diferentes enzimas, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, lo cual indicaría un desequilibrio en la homeostasis celular efecto de un estrés oxidativo. En la parte aérea, a mayor concentración de Ni a la que se expone a *E. crassipes*, se observa una disminución de las actividades de CAT y GR y un aumento en la actividad

de SOD, indicando una superproducción de peróxido de hidrógeno y una caída en la defensa enzimática antioxidante intervinientes en la eliminación de este ROS. Esto tendría como efecto la peroxidación lipídica observada en el aumento de la concentración de MDA. La presencia de nutrientes no afectó esta respuesta. Mientras que a la concentración menor de Ni, se observó un aumento de la actividad de POD y GR, lo cual estaría indicando una activación de la defensa enzimática antioxidante ante un estrés oxidativo moderado, observado en un leve aumento de la concentración de MDA, en parte aérea. La presencia de nutrientes a esta baja concentración de Ni favoreció la respuesta de la defensa enzimática antioxidante permitiendo la disminución de la concentración de MDA y por lo tanto el daño oxidativo. En raíz, la exposición de *E. crassipes* a Ni produjo un fuerte estrés oxidativo, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, observado por la disminución de las actividades de las enzimas CAT, POD y GR, por el aumento de la actividad de SOD y la concentración de MDA.

### **13.4 Experiencia N° 3: Influencia de la presencia de nutrientes en la acumulación y efectos de Zn (II) sobre *Eichhornia crassipes***

#### **13.4.1 Metodología**

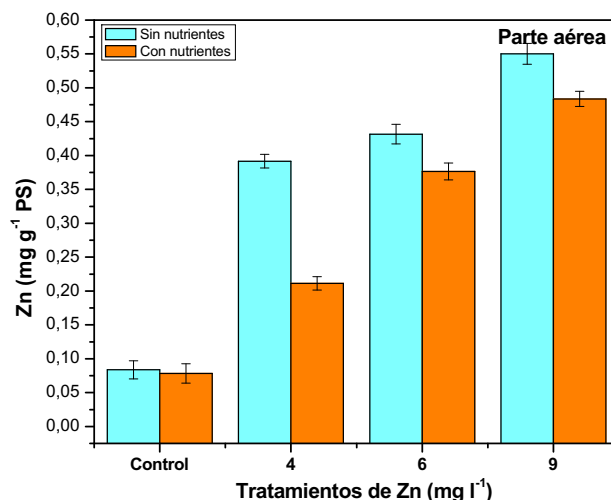
Las plantas recolectadas fueron aclimatadas en el laboratorio bajo condiciones controladas, explicadas en la sección de Metodología. Dos litros de agua de red y una planta (30 a 40 g de biomasa de planta fresca) fueron dispuestos en reactores experimentales de plástico. Una solución de Zn (II) (preparada usando  $ZnCl_2 \cdot 6H_2O$ ) fue agregada para obtener concentraciones de 4, 6 y 9 mg l<sup>-1</sup> finales. En forma paralela se realizaron otros tratamientos, con las mismas concentraciones de Cr (III) pero con el agregado de nutrientes: 5 mg l<sup>-1</sup> de P y 15 mg l<sup>-1</sup> de N. El pH del agua se mantuvo entre 5,8 y 6,3 (se usó HCl ó Na (OH)) para evitar la precipitación del metal. La duración de la exposición fue de 5 días, tomándose las muestras al finalizar la experiencia.

#### **13.4.2 Resultados**

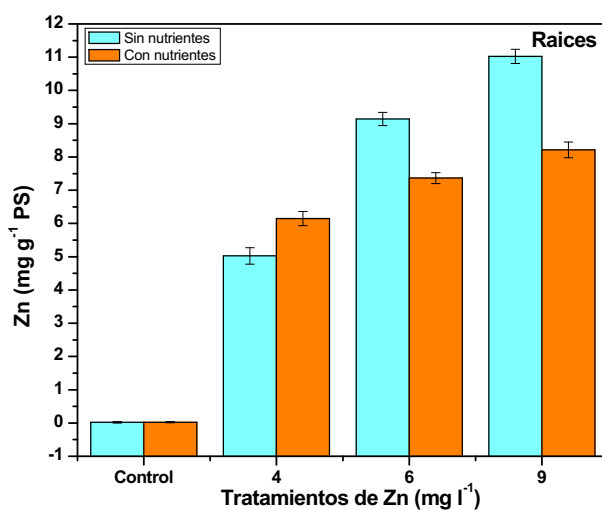
##### ***Acumulación de Zn***

(Fig. II.11 y II.12). Las mayores concentraciones de Zn se determinaron en las raíces (Fig. II.12), con concentraciones hasta 20 veces más que la de parte aérea. En la parte aérea se observó que la presencia de nutrientes disminuyó significativamente la concentración de Zn en comparación con los tratamientos donde no se agregó nutrientes. En raíz, la presencia de nutrientes provocó la disminución significativa de la concentración de Zn en comparación con la observada en los mismos tratamientos pero sin la presencia de nutrientes, pero solo en los tratamientos con las dos mayores

concentraciones de Zn. Mientras que para la concentración de  $4 \text{ mg l}^{-1}$ , la presencia de nutrientes produjo un aumento significativo (22,34 %) de la concentración del metal, respecto del mismo tratamiento sin nutrientes, en raíz.



**Figura II.11:** Acumulación de Zn en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Zn, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.



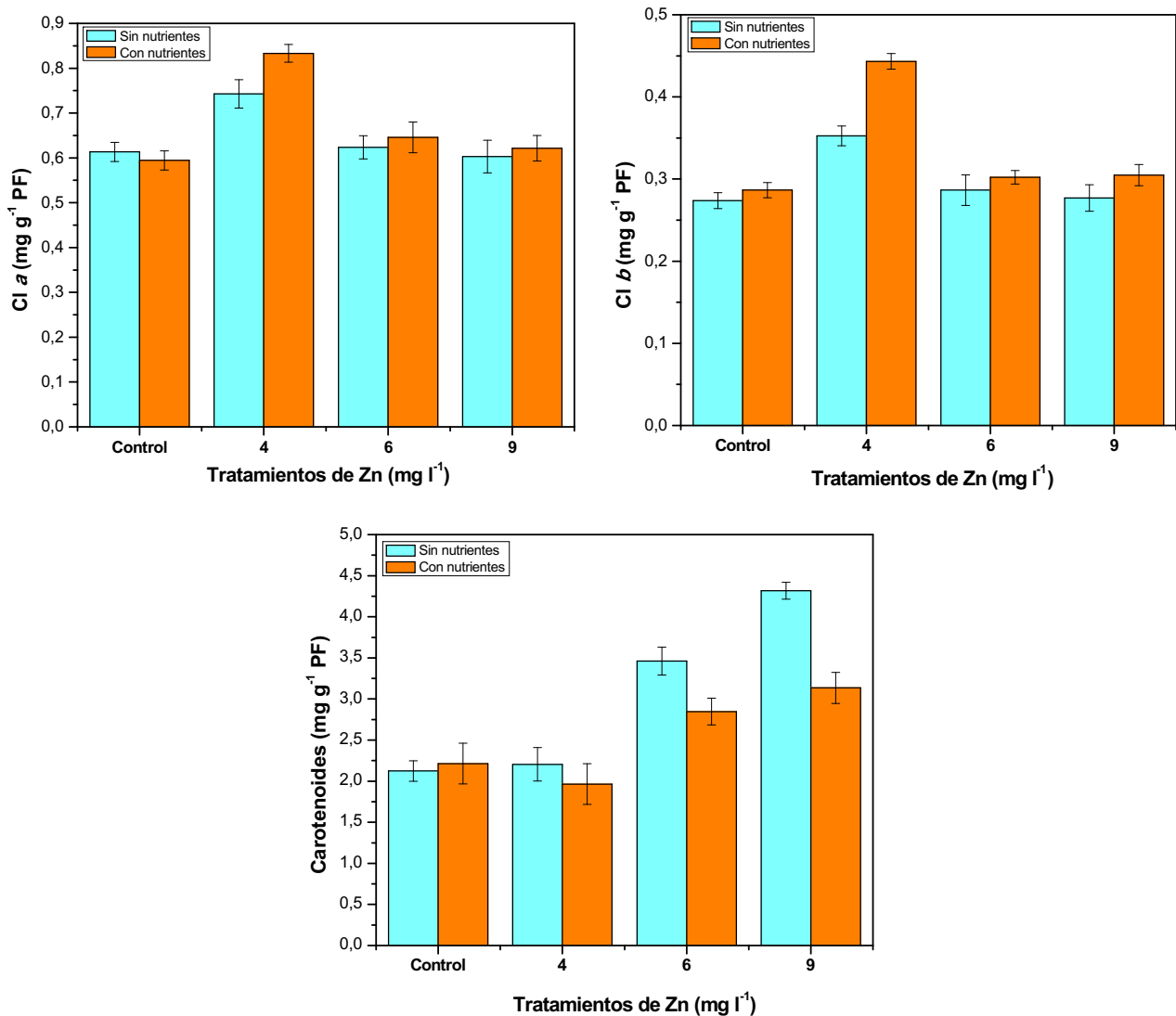
**Figura II.12:** Acumulación de Zn en raíz de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Zn, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

### *Efectos sobre pigmentos fotosintéticos*

En la Fig. II.13 se observan el efecto sobre parámetros fotosintéticos producidos por la exposición a Zn (II), tanto en presencia como en ausencia de nutrientes.

No se observó cambios significativos entre los controles con o sin nutrientes, para los parámetros medidos. La concentración de *Cl a* solo fue afectada en el tratamiento con la menor concentración de Zn (II) ( $4 \text{ mg l}^{-1}$ ), donde se registró un aumento del 20,05 % en ausencia de nutrientes y de un 40,18 % en presencia de nutrientes, respecto de los controles. Los demás tratamientos no presentaron

diferencias significativas, respecto de los controles. Similar efecto se observó en Cl *b*, donde solo para el tratamiento de 4 mg l<sup>-1</sup> de Zn (II), se observó un aumento en la concentración de un 28,86 % en ausencia de nutrientes y de un 54,72 % en presencia de nutrientes, respecto de los controles. La concentración de carotenoides fue afectada significativamente para las dos mayores concentraciones de Zn (II) a la que se expuso *E. crassipes*. El aumento de la concentración de carotenoides en presencia del metal fue del 62, 92 % (6 mg l<sup>-1</sup> de Zn) y del 103,19 % (9 mg l<sup>-1</sup> de Zn) en los tratamientos sin nutrientes, respecto del control. Mientras que para los tratamientos en presencia de nutrientes, fue del 28,62 % y 41,62 % para 6 y 9 mg l<sup>-1</sup> de Zn, respectivamente, en comparación al control. Es de destacar que los tratamientos con Zn (II) en presencia de nutrientes presentaron una disminución significativa de las concentraciones de carotenoides (entre un 17,75 y 27,39 %) respecto de los tratamientos donde no se agregó nutrientes.



**Figura II.13:** Efectos de diferentes concentraciones de Zn sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos de *E. crassipes*, en presencia y ausencia de nutrientes.

Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

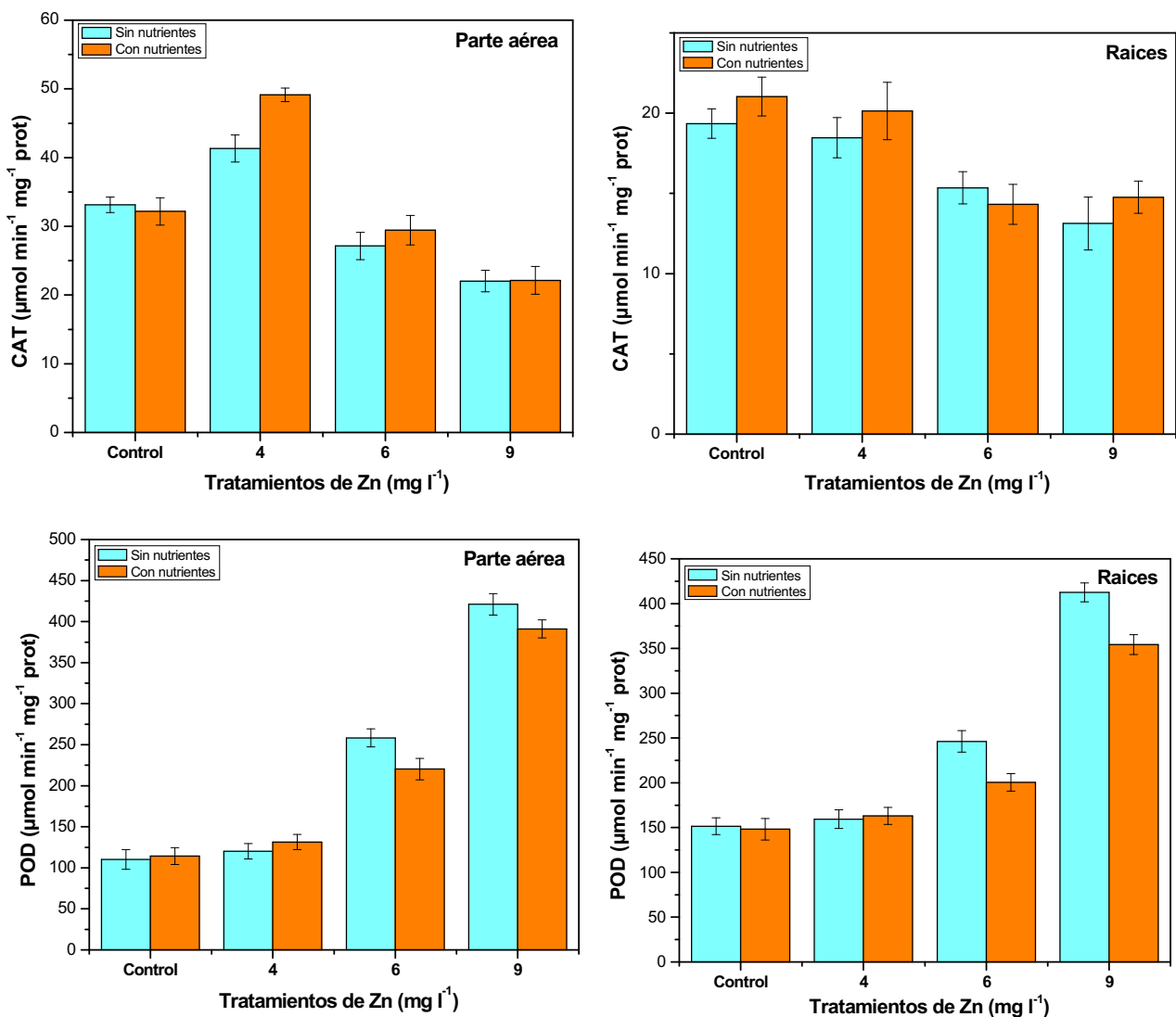
### ***Efectos sobre la actividad de CAT, POD, SOD y GR.***

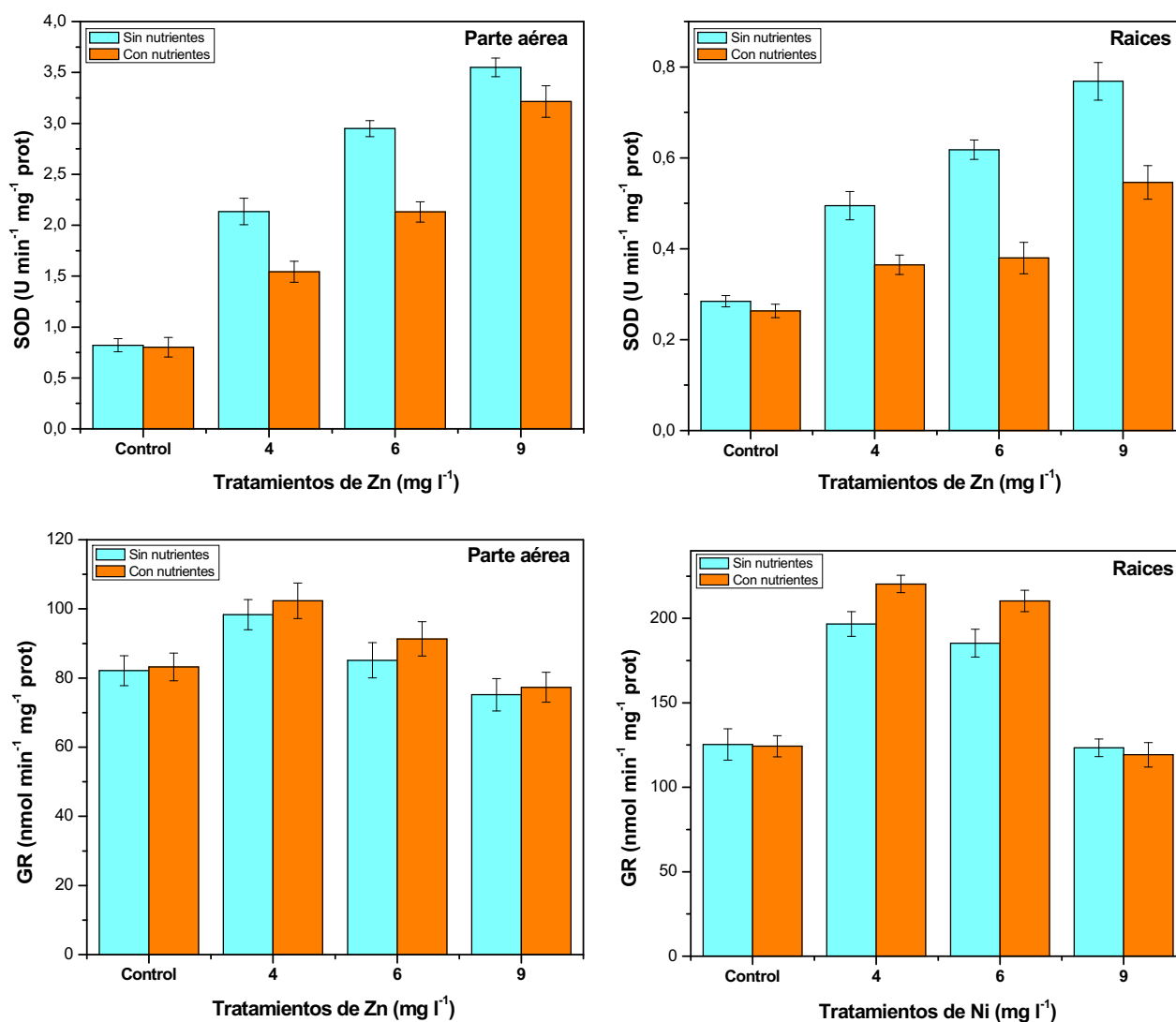
Se observa, según la **Fig. II.14**, que la exposición de *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Zn, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, produjo cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes en todo su tejido vegetal.

En parte aérea, en el tratamiento de 4 mg l<sup>-1</sup> de Zn se observó un aumento significativo (24,76 %) de la actividad de CAT, en ausencia de nutrientes, comparado con el control. Por otro lado, en los dos tratamientos de mayor concentración de Zn (6 y 9 mg l<sup>-1</sup>), también en ausencia de nutrientes, se observó una disminución significativa de la actividad de CAT, de 18,08 y 33,48 %, respecto del control. Por otra parte, en los tratamientos de 4 y 9 mg l<sup>-1</sup> de Zn, donde se aplicó nutrientes, se observó un aumento (52,75 %) y una disminución (31,18 %), respectivamente, de la actividad de CAT respecto del control. No se observaron diferencias significativas entre los mismos tratamientos de Zn, con y sin nutrientes, a excepción del tratamiento de 4 mg l<sup>-1</sup> de Zn, donde la actividad de CAT fue mayor significativamente en presencia de nutrientes. La actividad de POD aumentó significativamente para las dos concentraciones mayores de exposición de Zn, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes. En los tratamientos sin nutrientes se observó un aumento del 134,16 y 281,69 % y con nutrientes del 92,75 y 242,06 %, para 6 y 9 mg l<sup>-1</sup> de Zn respectivamente, respecto de los controles. En presencia de nutrientes la actividad de POD disminuyó significativamente respecto de los mismos tratamientos sin agregado de nutrientes, para las dos concentraciones mayores de exposición a Zn. La actividad de SOD aumentó significativamente, en parte aérea, para todos los tratamientos de Zn, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, respecto de los controles. Los aumentos observados variaron entre 92,60 y 332,11 %. Se observó además una disminución significativa de las actividades de SOD al comparar los mismos tratamientos con y sin nutrientes, obteniéndose una menor actividad, de hasta un 27 %, en presencia de nutrientes. La actividad de la enzima GR solo se fue afectada con el tratamiento de menor concentración de Zn, observándose un aumento significativo de 19,69 % en ausencia de nutrientes y de un 23,02 % en presencia de nutrientes, respecto de los controles.

En raíz, la actividad de CAT fue afectada a las dos más altas concentraciones de Zn a la que se expuso *E. crassipes*. Una disminución significativa de la actividad CAT (entre 20,67 y 32,17 %) para las concentraciones de 6 y 9 mg l<sup>-1</sup> de Zn, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, respecto de los controles. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las actividades de CAT de dichos tratamientos. Similarmente, la actividad de POD en raíz fue afectada solo para las dos mayores concentraciones de exposición de Zn, observándose un aumento significativo, respecto de los controles, tanto en presencia de nutrientes (62,57 y 172,39 %) como en ausencia (35,29 y 139,00 %).

Es de destacar que al comparar los tratamientos (6 y 9 mg l<sup>-1</sup> de Zn) con y sin nutrientes, se observó que la presencia de nutrientes disminuyó significativamente la actividad de POD (15,00 % en promedio). Un aumento significativo de la actividad de SOD se observó para todos los tratamientos con el aumento de la concentración de Zn en solución, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, respecto de los controles. En ausencia de nutrientes se observó un aumento significativo entre 73,89 y 169,98 % y en ausencia de nutrientes entre 38,54 y 107,53 %, respecto de los controles. Se observó también que en los tratamientos en presencia de nutrientes disminuyó significativamente la actividad de SOD al compararlos con los mismos tratamientos donde no se agregó nutrientes. En raíz, la actividad de GR aumentó significativamente para los tratamientos con 4 y 6 mg l<sup>-1</sup> de Zn, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, respecto de los controles. Los aumentos variaron entre un 47,87 y 77,21 %, respecto de los controles, pero se observó que en presencia de nutrientes la actividad de GR aumentó significativamente, para ambos tratamientos, por arriba del 10 % respecto de los mismos tratamientos pero sin el agregado de nutrientes.





**Figura II.14:** Efectos del Zn sobre las actividades de las enzimas antioxidantes de *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz.  
Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

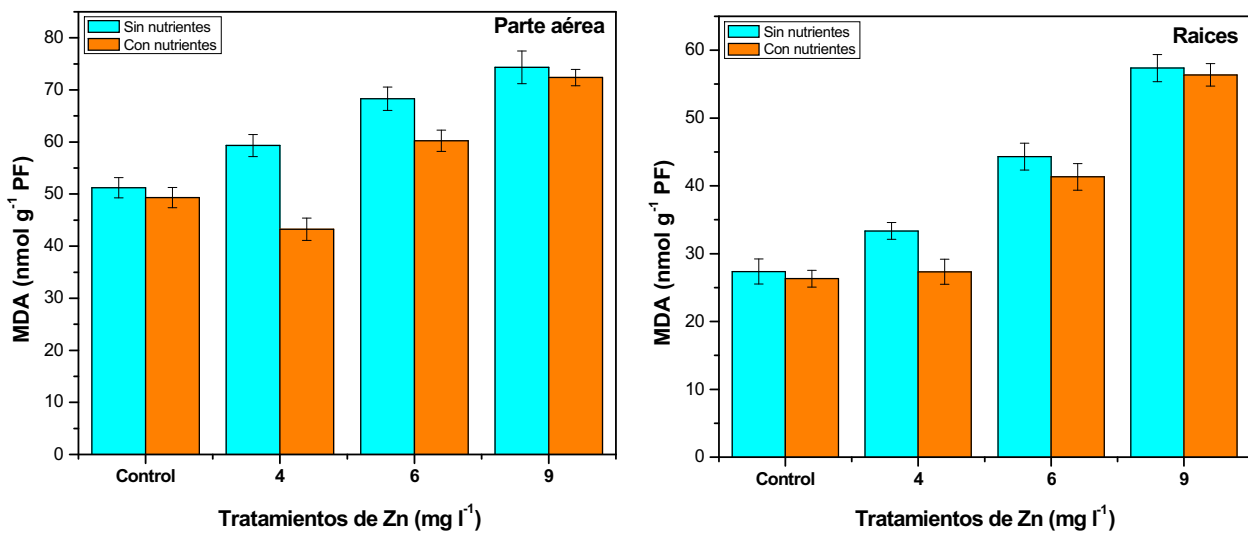
### *Efectos sobre la peroxidación de lípidos*

En la **Fig. II.15** se puede observar los efectos sobre la concentración de MDA, al exponer a *E. crassipes* a Zn, en presencia y ausencia de nutrientes.

En parte aérea se observó un aumento significativo (entre 16,00 y 45,08 %) para todos los tratamientos sin nutrientes en función del incremento de la concentración de Zn en solución, respecto del control. En presencia de nutrientes, la concentración de MDA disminuyó significativamente (13,00 %) para el tratamiento de 4 mg l<sup>-1</sup> de Zn, mientras que aumentó significativamente un 22,13 y 46,71 % para las dos concentraciones mayores de Zn, respectivamente, respecto del control. Sin embargo al comparar los mismos tratamientos con y sin nutrientes, se observó una disminución significativa de

un 27,12 y 11,83 % de la concentración de MDA para los tratamientos de 4 y 6 mg l<sup>-1</sup> de Zn en ausencia de nutrientes.

En raíz, la concentración de MDA incrementó significativamente en función del aumento de la concentración de Zn en solución, para los tratamientos sin nutrientes. Estos aumentos fueron del 21,90 al 109,64 %, respecto del control. En presencia de nutrientes, se observó un aumento significativo de la concentración de MDA para los dos tratamientos con la mayor concentración de Zn, siendo el incremento de un 56,98 % (6 mg l<sup>-1</sup> de Zn) y un 114,07 % (9 mg l<sup>-1</sup> de Zn). Solo para el tratamiento de 4 mg l<sup>-1</sup> de Zn se observó una disminución significativa del 18,07 % cuando se agregó nutrientes al medio, en comparación con el mismo tratamiento sin nutrientes.



**Figura II.15:** Efectos del Zn sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

### 13.4.3 Consideraciones finales de la experiencia N° 3

*E. crassipes* tuvo la capacidad de acumular Zn en todo el tejido vegetal, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes. En la parte aérea se observó que la presencia de nutrientes disminuyó significativamente la concentración de Zn en comparación a los tratamientos sin nutrientes. Mientras que en raíz, para los dos tratamientos de mayor concentración de Zn se observó una disminución de la acumulación en presencia de nutrientes respecto de los mismos tratamientos sin nutrientes. Sin embargo para la exposición de menor concentración de Zn, la presencia de nutrientes aumentó significativamente la acumulación de Zn en raíz.

La exposición a la menor concentración de Zn produjo en *E. crassipes* un aumento significativo de la concentración de clorofila *a* y *b*, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, observándose una mayor concentración de los pigmentos fotosintéticos, en presencia de nutrientes. La concentración de carotenoides aumentó significativamente a las dos mayores concentraciones de exposición de Zn.



Un mayor aumento de este pigmento fotosintético fue observado en los tratamientos en ausencia de nutrientes.

La actividad de las enzimas antioxidantes fue afectada por los tratamientos de Zn tanto en presencia como en ausencia de nutrientes. En parte aérea se observó que a la menor concentración de exposición de Zn, las actividades de las enzimas CAT y GR aumentaron, junto con el aumento de la actividad de SOD, lo cual estaría indicando la presencia de un desequilibrio en la homeostasis celular, pero una activación de la defensa antioxidante. En este caso al observar la concentración de MDA, se denota que la presencia de nutrientes incrementa la actividad de estas enzimas promoviendo la disminución de la concentración de MDA, por lo tanto anulando la peroxidación lipídica provocada por el metal. Mientras que, para el mismo tejido vegetal, se observó que al aumentar la concentración de Zn en solución, aumenta significativamente la actividad de SOD, pero existe una disminución de CAT y GR contrarrestada por un aumento de la actividad de POD, lo cual provoca un estrés oxidativo observado en el aumento de la concentración de MDA. Sin embargo, para los mismos tratamientos pero en presencia de nutrientes puede observarse que las actividades de SOD y POD disminuyen, disminuyendo la concentración de MDA, pero de igual manera presentando un incremento significativo por sobre el control. Se podría concluir parcialmente que la concentración de nutrientes utilizada solo tiene un efecto atenuador del daño oxidativo del metal, a la menor concentración de Zn en solución estudiada. En raíz, la actividad de SOD incrementó significativamente en función del aumento de la concentración de exposición a Zn, observándose una disminución de la actividad cuando se agregó nutrientes a la solución, sin embargo la actividad fue mayor significativamente que el control. La actividad de CAT disminuyó, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, para las dos concentraciones más altas de Zn, mientras que la actividad de POD y GR aumentaron para 6 y 9 mg l<sup>-1</sup> de Zn y para 4 y 6 mg l<sup>-1</sup> de Zn, respectivamente. Esto sería entendido como una activación en primera instancia de GR para eliminar el peróxido de hidrógeno producido por la actividad de SOD y demás ROS, mientras que al seguir aumentando el estrés oxidativo se activaría POD, manteniéndose la actividad de GR. Finalmente al aumentar el estrés oxidativo disminuye la actividad de GR, quedando solo POD como la enzima encargada de eliminar la sobre producción de ROS. A pesar de estos procesos metabólicos, *E. crassipes* no pudo evitar el aumento de la concentración de MDA, lo cual indicaría la presencia de peroxidación lipídica, resultado de un daño oxidativo. La presencia de nutrientes tuvo un efecto positivo solo para la menor concentración de exposición a Zn, en raíz. Por un lado, disminuyó la concentración de MDA hasta valores cercanos al control, lo cual indicaría una homeostasis celular regular en la raíz. Esto se produjo principalmente por el efecto observado sobre la actividad de SOD, al disminuir significativamente respecto de los mismos tratamientos sin nutrientes (lo cual indicaría una disminución en la producción de ROS) y por el aumento en la actividad de GR

(enzima pivotante del sistema de defensa enzimático antioxidante). Mientras que a mayores concentraciones de Zn en solución, la presencia de nutrientes tuvo efectos sobre SOD, POD y GR, pero aun así no se pudo evitar un daño oxidativo, observado en el incremento significativo de la concentración de MDA.

### 13.5 Discusión Capítulo II

Varios estudios muestran que la acumulación de metales pesados en plantas es influenciada por el enriquecimiento de la solución con nutrientes. En un estudio llevado a cabo por O’Keeffe y Hardy (1984), se observó que la sorción de Cd en *E. crassipes* fue mucho mayor en agua desionizada que en 50 % de solución Hoagland. Lee y Wang (2001) reportaron que un incremento en la concentración de nitrato en solución, resultó en un aumento significativo de la acumulación de Cd in *Ulva fastica*. Por otro lado, Hadad y col. (2009) observaron que al ser expuesta *E. crassipes* a diferentes concentraciones de Ni, Cr (III) y Zn con el agregado de nutrientes, este último no afectó la concentración de Ni y Cr en los tejidos, mientras que la concentración de Zn en la planta disminuyó significativamente. Leblebici y col. (2011, 2015) observaron una disminución significativa de la acumulación de Pb tanto en *L. minor* como en *S. polyrhiza*, cuando a ambas se las exponía a soluciones con contenido de Pb en combinación con nutrientes. En un estudio reciente, Di Luca y col. (2013) observaron que *Pistia stratiotes* mostró una mayor remoción de Cr (III) cuando se enriqueció el medio con nutrientes. Es un hecho que compuestos orgánicos tales como ácido oxálico, málico, etc. son potenciales quelantes de Cr (III) (Nakayama, 1981). En un estudio realizado con *Triticum vulgare*, Srivastava y col. (1999) evaluaron la movilización de Cr (III) en presencia de ácidos orgánicos, realizando el estudio en sistema hidropónico. Llegaron a la conclusión de que el incremento de la concentración de ácidos orgánicos en solución, incrementó la sorción de Cr, sin afectar la distribución entre la raíz y la parte aérea de la planta. Sin embargo, la exudación de ácidos orgánicos es incrementada en muchas especies de plantas bajo deficiencia de P (Grierson, 1992). Por lo cual podemos hipotetizar que al agregar nutrientes a la solución, incrementamos la concentración de P, lo cual provocaría una inhibición de producción de exudados de ácidos orgánicos y esto disminuiría la formación de complejos con Cr (III) y una menor sorción del mismo por la raíz. Sin embargo, esta disminución de la concentración de Cr en raíz, también podría ser por un incremento de la biomasa, favorecida por la presencia de nutrientes, lo cual

provocaría una “dilución” de la concentración de Cr en la raíz. En cuanto a la acumulación de Ni en tejidos de *E. crassipes*, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones ensayadas al agregar nutrientes a la solución, en concordancia con lo observado en otras macrófitas (Göthberg y col., 2004, Hadad y col., 2007). Mientras que la presencia de nutrientes produjo una disminución de la concentración de Zn en parte aérea, en raíz solo se observó lo mismo para las exposiciones de mayor concentración. Esto fue observado también por Gianquinto y col. (2000), quienes concluyeron que la concentración de Zn en hojas de *Phaseolus vulgaris* disminuyó por la adición de P a plantas expuestas a bajas concentraciones de Zn. La razón por la que la translocación haya sido menor en presencia de nutrientes, puede ser por dos causas: por un lado porque la sorción de Zn en raíz fue menor, y por otro lado, el Zn podría formar fosfatos pocos solubles en el apoplasto de la corteza de la raíz, por lo cual se mantendría en dicho tejido (Cakmak y Marschner, 1988). Estas dos causas se deben a que el Zn es absorbido por la planta como catión ( $Zn^{+2}$ ) y el fósforo como iones de fosfatos ( $H_2PO_4^{-1}$  y  $HPO_4^{-2}$ ). Estos iones tienen una atracción eléctrica entre sí, facilitando la formación de un enlace químico, ya sea en el medio o en el tejido de la planta. Si el exceso de P se une a una cantidad de Zn normalmente disponible para la planta, el resultado puede ser la deficiencia de Zn inducida por P y viceversa (Marschner y Cakmak, 1986). A excepción de la concentración de exposición de  $4\text{ mg l}^{-1}$  de Zn, donde la presencia de nutrientes aumentó significativamente la concentración de Zn en raíz, respecto del mismo tratamiento sin nutrientes. Este caso en particular puede deberse a que en presencia de nutrientes la planta incrementa su actividad metabólica (observada en el incremento de la concentración de clorofilas) debido a un crecimiento vegetal o a una necesidad energética para procesos metabólicos-enzimáticos, lo cual conlleva un aumento del consumo de otros micros y macronutrientes. En este caso Zn cumple diversos roles en diferentes procesos biológicos, por lo cual es de esperar una mayor sorción del mismo, sin sobrepasar un nivel de toxicidad.

En los tratamientos con Cr en presencia de nutrientes, se observó un aumento de la concentración de pigmentos fotosintéticos, respecto de los mismos tratamientos sin nutrientes. Esto podría estar relacionado con el incremento de la actividad de las enzimas del sistema de defensa antioxidante, debido al estrés oxidativo producido por el metal. Un aumento de las actividades enzimáticas conlleva un alto gasto energético, que estaría suplantado por un incremento de la actividad fotosintética. Consecuencia de la activación de la defensa enzimática antioxidante es la disminución de la concentración de MDA observada tanto en parte aérea como en raíz. Sin embargo, también puede considerarse que una importante razón de la disminución de la toxicidad de Cr es debido a la disminución de sorción en presencia de nutrientes. La disminución de los efectos tóxicos del Cr, en presencia de nutrientes, fue previamente reportado por Hadad y col. (2007) en *S. herzogii* y por Sayantan (2013) en *R. sativus*.

En los tratamientos con Ni, la presencia de nutrientes en el medio no tuvo efectos importantes en el metabolismo de la planta. Por lo cual podría concluirse que a las concentraciones estudiadas, el Ni tuvo un efecto tóxico mayor que los otros dos metales, aún con el agregado de nutrientes al medio, demostrado por la disminución de las actividades enzimáticas de la defensa antioxidante lo que provocó un aumento de la concentración de MDA, efecto que representa un aumento de la peroxidación lipídica provocando un daño oxidativo. Similares consecuencias fueron observadas por Hadad y col. (2007) en *S. herzogii* y Mufarrege y col. (2010) en *P. stratiotes*, quienes reportaron una reducción de la tasa de crecimiento relativo y de la concentración de Cl *a*, cuando determinaron la tolerancia de las mismas respecto de la exposición a Cr, Ni y Zn, en presencia de P. Aun así, cabe destacar que a la menor concentración de exposición de Ni (2mg l<sup>-1</sup>), en la parte aérea se observó una concentración de MDA cercana al valor control, lo cual respondería al aumento de las actividades de POD y GR y una disminución de la actividad de SOD, significando esto una homeostasis celular. El hecho de que se observe también un aumento de la concentración de carotenoides (pigmento con características antioxidantes) y de Cl *a*, son motivos para establecer que la presencia de nutrientes favoreció la tolerancia a Ni. Por un lado, el P es un elemento esencial en la fotofosforilación (proceso de síntesis de ATP) y en la asimilación del carbono en la fotosíntesis (Zhou y col., 1993), lo cual permitiría hipotetizar que favoreció la continuidad de la actividad fotosintética permitiendo la producción de energía para el metabolismo enzimático. Por otro lado, el N juega un rol fisiológico importante como molécula señal bioactiva en la planta en respuesta a stress por metales pesados (Hassan y col., 2005, Arasimowicz y Floryszad-Wieczorek, 2007). En un estudio reciente, Zhang y col. (2014) estudiaron el efecto de N sobre la actividad enzimática y la expresión genética en hojas de *Populus*, sujetas a estrés por Cd. Con los resultados obtenidos, se hipotetizó que el agregado de N incrementó los niveles de L-glutamato y L-cisteína para enzimas que sintetizan GSH. Esta molécula puede directamente eliminar la sobreproducción de ROS por una reacción de reducción de los metabolitos, pero también interviene en el ciclo de Halliwell-Asada donde se encuentra la enzima GR, lo cual estaría en concordancia con nuestros resultados. El aumento de GSH, provocado por la presencia de N, conllevaría una mayor actividad del ciclo de Halliwell-Asada y con esto, un aumento de las actividades de las enzimas intervinientes, una de las cuales es GR, la cual incrementó su actividad en nuestra experiencia.

Por último, tanto el P, el N, como el Zn son nutrientes esenciales que son necesarios para el crecimiento normal de la planta. Estos nutrientes son antagonistas en ciertas circunstancias, en especial el P y el Zn (explicado anteriormente). Para la discusión de esta experiencia debemos hacer una separación en los resultados obtenidos para las dos concentraciones mayores (6 y 9 mg l<sup>-1</sup> de Zn) y la de menor concentración (4 mg l<sup>-1</sup> de Zn) de exposición. Por un lado, podemos observar que a las dos

mayores concentraciones, aun cuando la concentración de Zn disminuyó en presencia de nutrientes: la concentración de carotenoides incrementó, disminuyó la actividad de CAT (en parte aérea y raíz) y aumentó la actividad de POD y SOD (en ambos tejidos), lo cual establecería la existencia de un estrés oxidativo, que se vio reflejado en el correspondiente aumento de la concentración de MDA en ambos tejidos vegetales. La presencia de nutrientes no pudo regular el estrés oxidativo producido por la acumulación de Zn (discutido en la **Experiencia 3-Capítulo II**). Por otro lado, para la experiencia de menor concentración de exposición a Zn, se observó en presencia de nutrientes, una marcada disminución de la concentración de Zn en parte aérea y un aumento de la concentración en raíz, respecto de los mismos tratamientos sin nutrientes. La disminución de la concentración de Zn en parte aérea favoreció el incremento de la concentración de Cl *a* y *b* y la disminución de la concentración de carotenoides, acompañado por un aumento de las actividades de CAT y GR y una caída en la actividad de SOD (lo cual indicaría la presencia de ROS). Pero que al observar los valores de las concentraciones de MDA, podemos concluir que *E. crassipes* fue favorecida por tolerar las concentraciones de Zn en parte aérea, por la presencia de nutrientes. Sin embargo, en raíz una disminución en la actividad de SOD e incremento en la actividad de GR constituyó una respuesta suficiente para establecer la homeostasis celular. En concordancia con nuestro estudio, Hadad y col. (2007) observaron que al exponer a *S. herzogii* a bajas concentraciones de Zn, la presencia de nutrientes contribuyó al incremento de la capacidad de crecimiento y una disminución de la concentración de Zn en las hojas.

### **CAPÍTULO III**

**Exposición de *E. crassipes* a soluciones combinadas de Cr (III), Ni (II) y Zn (II), en presencia y ausencia de nutrientes: efectos sobre sorción y parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo**

## 14 CAPÍTULO III

### **Exposición de *E. crassipes* a soluciones combinadas de Cr (III), Ni (II) y Zn (II), en presencia y ausencia de nutrientes: efectos sobre sorción y parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo**

#### 14.1 Introducción general

Como se mencionó anteriormente en la **Introducción (Sección 1.2 y 1.6)**, en los wetlands construidos, donde se utiliza a *E. crassipes*, los efluentes industriales no contienen un solo contaminante sino que son matrices químicas complejas, que pueden contener varios contaminantes. El wetland que se diseñó y se continúa monitoreando en la ciudad de Santo Tomé, Santa Fe (Argentina), en una industria metalúrgica para tratar sus efluentes, presenta Cr (III), Ni (II) y Zn (II) (efluente industrial) y P y N (efluente cloacal), en forma conjunta. En este caso coexisten en el efluente metales pesados y nutrientes.

Por un lado, sabemos que la presencia de metales pesados, en forma aislada, puede producir toxicidad en las plantas, cuando se encuentran en concentraciones por encima del umbral (**Introducción Sec. 1.5**). Mientras que por otro lado, el enriquecimiento con nutrientes mejora la tolerancia de las macrófitas a los metales pesados y por lo tanto permite el desarrollo de la vegetación en los humedales artificiales en las concentraciones de metales que de otro modo causarían su muerte (**Introducción Cap. II**). Sin embargo, es de destacar que se ha sugerido que la suplementación con Zn, en exposiciones combinadas de metales pesados, cumple una función protectora en las plantas ante el estrés oxidativo ocasionado por otros metales pesados (Aravind y Prasad, 2005). Wang y col. (2009) concluyeron en su trabajo que el incremento de la respuesta antioxidante en *H. verticillata*, luego de ser expuesta a diferentes concentraciones de Zn, podría mejorar la capacidad de tolerancia en la planta para afrontar el estrés de otros metales. Este efecto se ha observado, por ejemplo, en *Ceratophyllum demersum* (expuesta a Cd), *Lepidium sativum* y *Spirodela polyrrhiza* (expuesta a Cr, Cu y Ni), en *Triticum aestivum* (expuesto a Cd) y en *Brassica juncea* (expuesta a Cu, Co, Cr y Ni) (Aravind y Prasad, 2004, Montvydienè y Marčiulionienè, 2007, Aravind y col., 2009, Kaur y col., 2009). Ya en 1995, Marschner exponía que el Zn estaba involucrado en el balance de la producción y eliminación de ROS, debido a su participación como constituyente o cofactor de varias enzimas (entre ellas, SOD), como inhibidor de la producción de  $O_2^-$  incrementando la NADH oxidasa y como protector de las membranas a través de la unión a compuestos que contienen grupos tiol (-SH).

Por lo tanto en este último Capítulo se evaluará como la presencia de Zn y nutrientes afectará la respuesta de *E. crassipes* ante la exposición combinada de Cr y Ni. Para ello, se expondrá *E. crassipes*, durante 5 días, a la presencia combinada de nutrientes, Cr ( $4 \text{ mg l}^{-1}$ ), Ni ( $4 \text{ mg l}^{-1}$ ) y Zn, este último en una concentración menor ( $2 \text{ mg l}^{-1}$ ), ya que en el **Capítulo II (Experiencia N° 3)** se observó que a la concentración de  $4 \text{ mg l}^{-1}$  se producía un daño oxidativo aún con aumento de las actividades de las enzimas antioxidantes.

#### **14.1.1 Metodología**

Las plantas fueron aclimatadas en el laboratorio bajo condiciones controladas, explicadas en la sección de Metodología. Dos litros de agua de red de clorada y una planta (30 a 40 g de biomasa de planta fresca) fueron dispuestos en reactores experimentales de plástico. La solución de Ni (II), Cr (III) y Zn (II) (preparadas usando  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{ZnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) fueron agregadas para obtener concentraciones de 4, 4 y  $2 \text{ mg l}^{-1}$  finales, respectivamente. Por un lado se realizaron tres tratamientos con los metales presentes en forma individual en el medio, por otro lado, un cuarto tratamiento con la presencia de Cr (III) y Ni (II) y por último, un tratamiento en presencia de Cr (III), Ni (II) y Zn (II). En forma paralela se realizó una réplica de los tratamientos anteriores pero con el agregado de nutrientes:  $5 \text{ mg l}^{-1}$  de P y  $15 \text{ mg l}^{-1}$  de N. El pH del agua se mantuvo entre 6.8 y 7.0 (usando HCl e Na (OH)) para evitar la precipitación del metal. La duración de la exposición fue de 5 días, tomándose las muestras al finalizar la experiencia.

#### **14.1.2 Resultados**

##### ***Acumulación de metales***

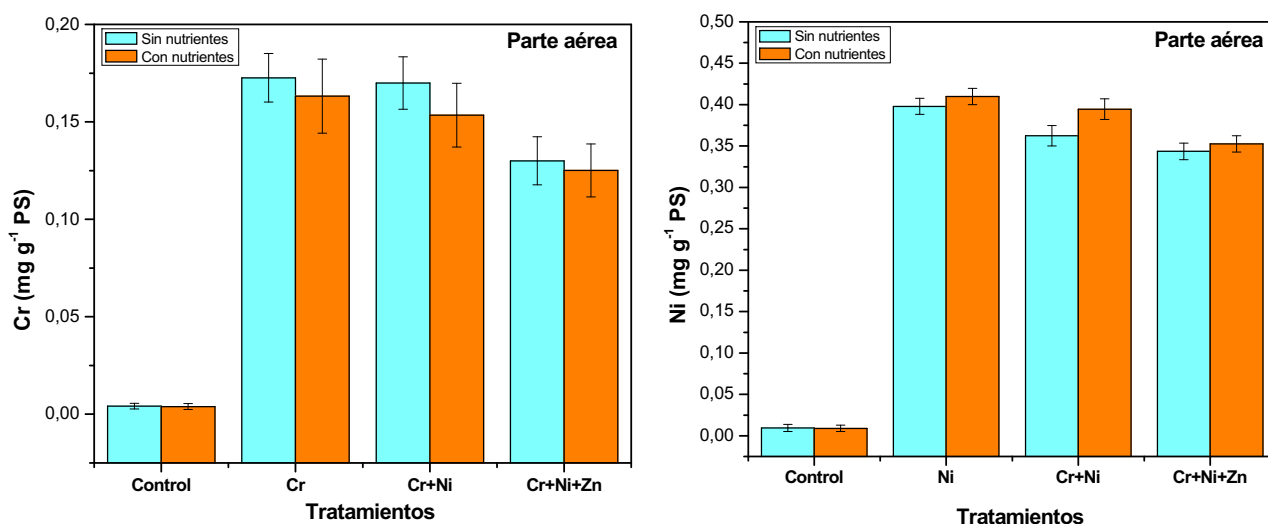
Se observó un aumento significativo de los metales Cr y Ni, para todos los tratamientos, en comparación a los controles, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes en ambos tejidos vegetales (**Fig. III.1 y III.2**). Las mayores concentraciones de metal se determinaron en las raíces (**Fig. III.1**), con concentraciones hasta 20 (para Cr) y 10 (para Ni) veces más que las de la parte aérea.

En parte aérea, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de Cr, entre los tratamientos Cr y Cr+Ni, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes. En el tratamiento Cr+Ni+Zn, la concentración final de Cr fue significativamente menor (24,68 % aprox.) que los demás tratamientos, en ausencia de nutrientes. Mientras que en presencia de nutrientes la concentración de Cr disminuyó significativamente (23,33 % aprox.) en el tratamiento Cr+Ni+Zn, respecto de los demás tratamientos. Sin embargo es de destacar que entre los mismos tratamientos, no hubo diferencias significativas en la concentración de Cr, al agregar nutrientes. Mientras que la concentración de Ni

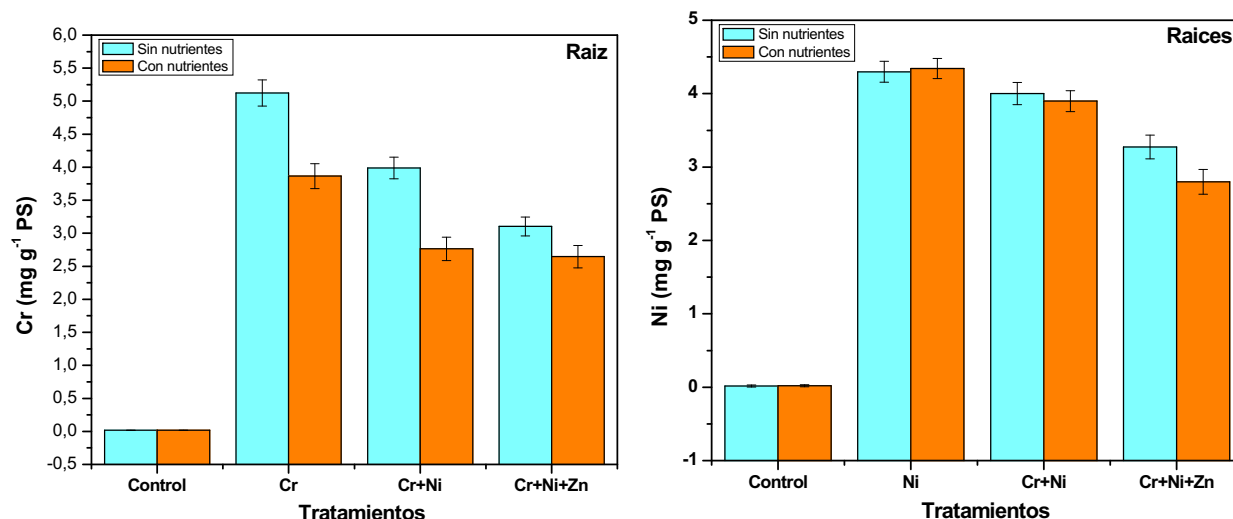


disminuyó significativamente para los tratamientos de Cr+Ni (12,00 %) y Cr+Ni+Zn (13,62 %), respecto del tratamiento con el metal solo, en ausencia de nutrientes. Solo en el tratamiento de Cr+Ni+Zn se observó una disminución significativa (13,99 % aprox.) de la concentración de Ni, respecto de los demás tratamientos, en presencia de nutrientes. Solo en el tratamiento Cr+Ni, se observó un aumento significativo (11,84 %) de la concentración de Ni al agregar nutrientes, respecto del mismo tratamiento sin nutrientes.

En raíz, la concentración de Cr disminuyó significativamente en los tratamientos de Cr+Ni (22,18 %) y en Cr+Ni+Zn (39,46 %), respecto del tratamiento con el metal solo, en ausencia de nutrientes. Mientras que en presencia de nutrientes, la concentración de Cr disminuyó significativamente para los tratamientos de Cr+Ni (11,00 %) y CR+Ni+Zn (35,55 %), respecto del tratamiento con el metal solo. En todos los tratamientos, la presencia de nutrientes disminuyó la concentración de Cr (entre un 14,72 y 30,68 %), respecto de los mismos tratamientos pero sin agregado de nutrientes. La concentración de Ni, disminuyó significativamente solo para el tratamiento de Cr+Ni+Zn (23,84 %) respecto del tratamiento con el metal solo y Cr+Ni, en ausencia de nutrientes. En presencia de nutrientes, la concentración de Ni disminuyó significativamente un 11,01 % (tratamiento Cr+Ni) y un 35,55 % (tratamiento Cr+Ni+Zn), respecto del tratamiento con el metal solo. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos con y sin nutrientes, a excepción del tratamiento Cr+Ni+Zn, donde la presencia de nutrientes disminuyó un 14,50 % la concentración de Ni.



**Figura III.1:** Acumulación de Cr y Ni en parte aérea de *E. crassipes* a diferentes tratamientos, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.



**Figura III.2:** Acumulación de Cr y Ni en raíz de *E. crassipes* a diferentes tratamientos, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

### *Efectos sobre pigmentos fotosintéticos*

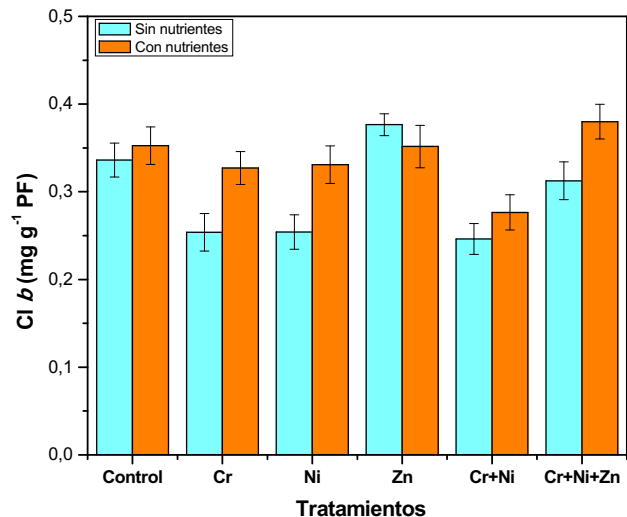
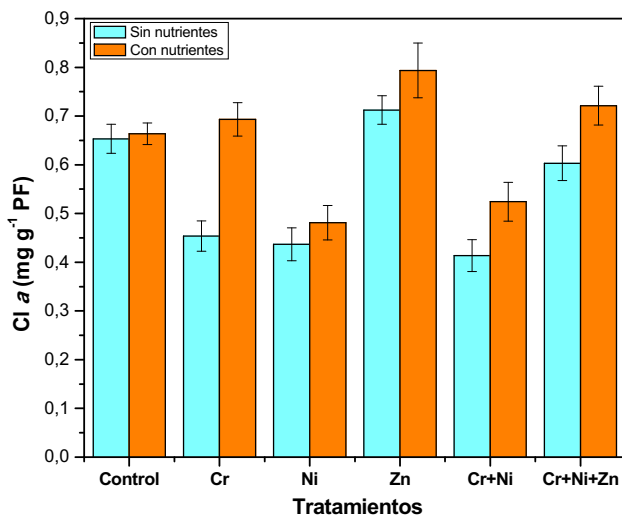
En la **Fig. III.3** se observa el efecto de diferentes tratamientos, sobre los parámetros fotosintéticos de *E. crassipes*.

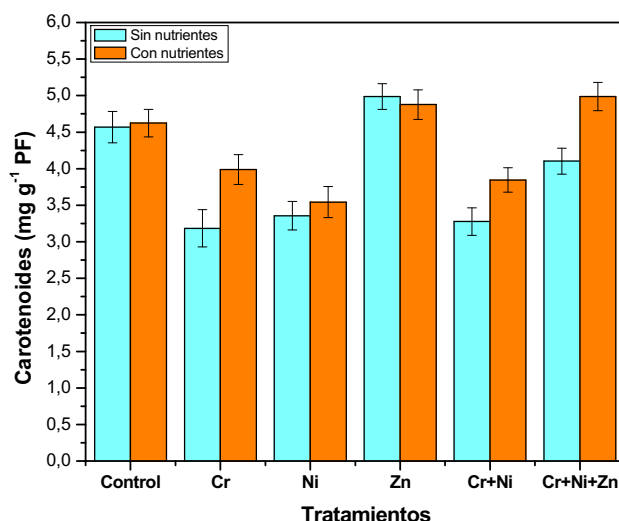
La concentración de Cl *a* disminuyó significativamente en los tratamientos de Cr (30,55 %), Ni (33,17 %) y Cr+Ni (36,67 %), respecto de los controles, en ausencia de nutrientes. Mientras que en presencia de nutrientes se observó una disminución significativa de la concentración de Cl *a*, en los tratamientos de Ni (27,48 %) y Cr+Ni (21,01 %), respecto del control. Aun así, se observó, en presencia de nutrientes, un aumento de la concentración de Cl *a* en el tratamiento con Zn (19,59 %), respecto del control. Por otro lado, al comparar cada tratamiento en presencia y ausencia de nutrientes, se observó que la concentración de Cl *a* aumentó significativamente en 52,79 % (tratamiento de Cr), 26,70 % (tratamiento de Cr+Ni) y de 19,60 % (tratamiento de Cr+Ni+Zn), cuando al medio se agregó nutrientes. Es de destacar que en presencia de Zn (tratamiento de Cr+Ni+Zn) y ausencia de nutrientes, la concentración de Cl *a* incrementó significativamente un 32,93 %, 38,14 % y 45,80 %, respecto de los tratamientos con Cr, Ni y Cr+Ni, sin presentar diferencia significativa con el control.

La concentración de Cl *b*, fue afectada de una forma similar a la de Cl *a*. Se observó una disminución de la concentración de Cl *b*, en ausencia de nutrientes, en los tratamientos de Cr (24,56 %), Ni (24,48 %) y Cr+Ni (26,79 %), respecto del control. Los tratamientos con nutrientes no tuvieron diferencias significativas con el control, a excepción del tratamiento Cr+Ni, donde se observó una disminución significativa de la concentración de Cl *b*, en un 21,59 %. Al comparar los mismos tratamientos con y sin nutrientes, se observó que hubo un incremento significativo de la concentración de Cl *b* de 28,88 %, 30,33 % y 21,53 % en los tratamientos de Cr, Ni y Cr+Ni+Zn en presencia de

nutrientes. Cabe destacar que en ausencia de nutrientes y presencia de Zn (tratamientos Cr+Ni+Zn), la concentración de Cl *b* incrementó significativamente en un 23,19 %, 23,06 % y 26,95 %, respecto de los tratamientos con Cr, Ni y Cr+Ni.

La concentración de carotenoides disminuyó significativamente, en ausencia de nutrientes, para los tratamientos de Cr (30,29 %), Ni (26,53 %) y Cr+Ni (28,29 %), respecto del control. Mientras que en presencia de nutrientes, también se observaron disminuciones significativas en los tratamientos de Cr (13,75 %), Ni (23,38 %) y Cr+Ni (16,82 %), respecto del control. Sin embargo, el agregado de nutrientes incrementó la concentración de carotenoides en un 25,22 %, 17,39 % y 21,56 %, en los tratamientos de Cr, Cr+Ni y Cr+Ni+Zn, respecto de los mismos tratamientos sin el agregado de nutrientes. Es importante observar que en el tratamiento Cr+Ni+Zn se observó un incremento significativo de más del 20 % en la concentración de carotenoides respecto de los tratamientos con Cr, Ni y Cr+Ni, mientras que una disminución significativa del 17,73 % respecto del tratamiento con Zn, todos sin el agregado de nutrientes.





**Figura III.3:** Efectos sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos en *E. crassipes* a diferentes tratamientos, en presencia y ausencia de nutrientes. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

#### ***Efectos sobre la actividad de CAT, POD, SOD y GR.***

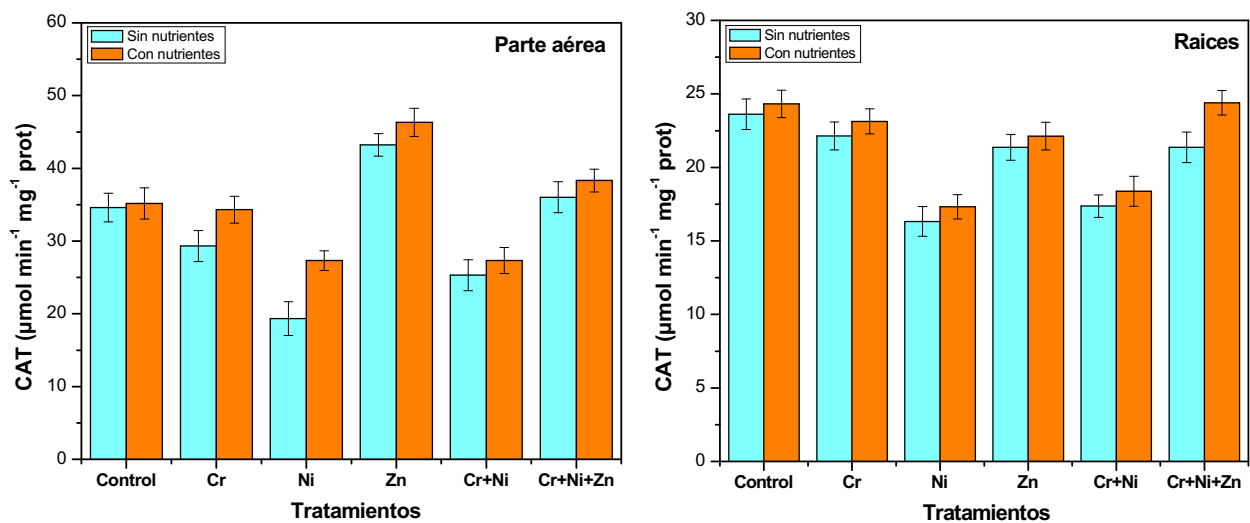
Se observa, según la **Fig. III.4**, que la exposición de *E. crassipes* a los diferentes tratamientos, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, produjo cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes en toda la planta.

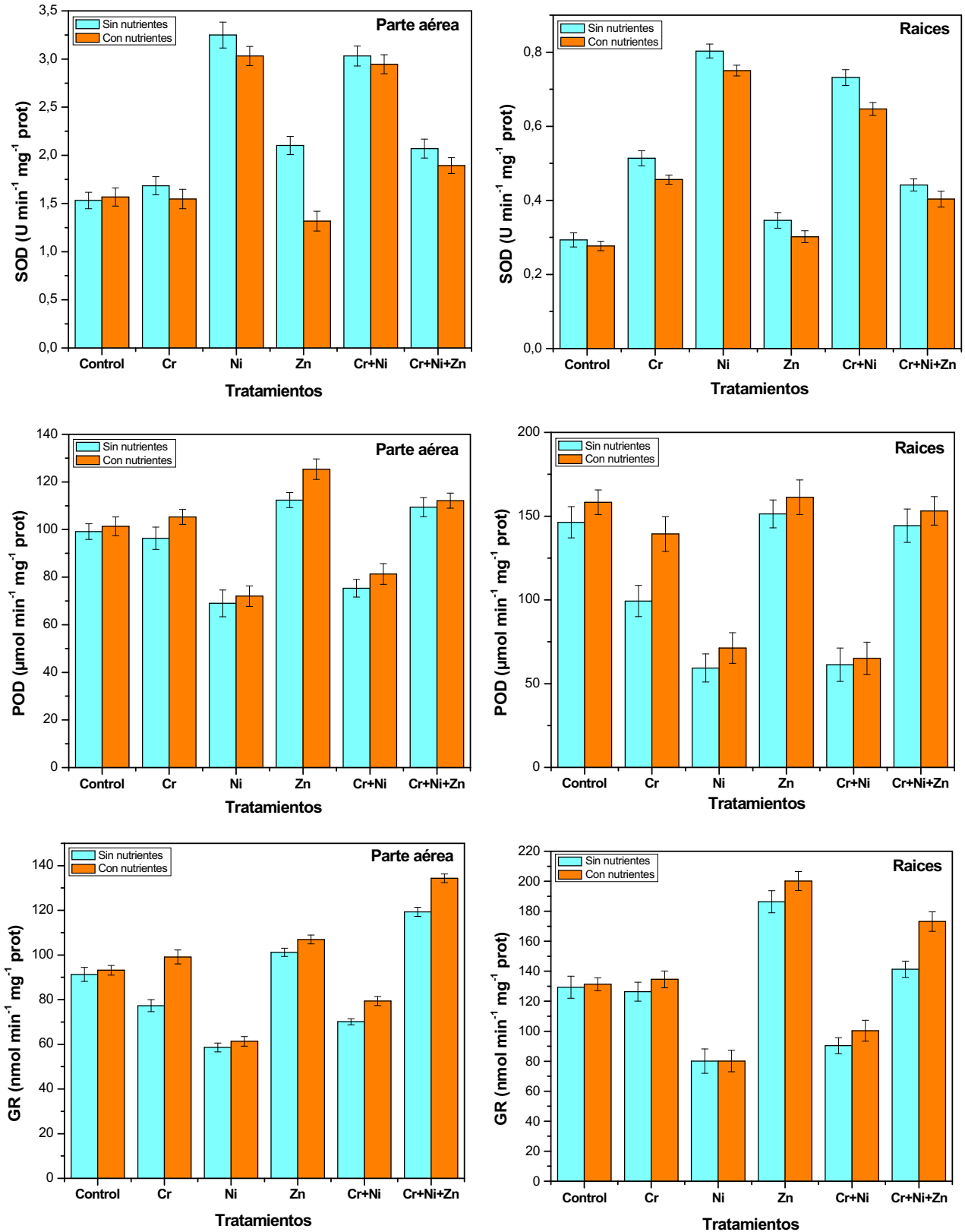
En parte aérea, la actividad de CAT disminuyó significativamente, en ausencia de nutrientes, para los tratamientos con Cr (15,29 %), Ni (44,11 %) y Cr+Ni (26,86 %), respecto del control. Mientras que un aumento significativo se observó para el tratamiento con Zn (24,84 %), en presencia de nutrientes, respecto del control. En presencia de nutrientes se observa que hubo una disminución significativa de la actividad de CAT para los tratamientos con Ni (22,32 %) y Cr+Ni (22,33 %), respecto del control. Al comparar los mismos tratamientos, en presencia y ausencia de nutrientes, se observó un aumento de la actividad de CAT solo para los tratamientos con Cr y Ni. La presencia de Zn incrementó la actividad de CAT, al comparar el tratamiento con Cr+Ni+Zn, con la combinación de Cr+Ni y los tratamientos con Cr y Ni, tanto en ausencia como en presencia de nutrientes, pero sin diferencias con el control. La actividad de SOD aumentó significativamente para los tratamientos de Ni (112,13 %), Zn (37,31 %), Cr+Ni (97,92 %) y Cr+Ni+Zn (35,14 %), en ausencia de nutrientes, respecto del control. Mientras que en los tratamientos con nutrientes, se observó un aumento significativo de la actividad de SOD para el tratamiento con Ni (93,47 %), Cr+Ni (88,06 %) y Cr+Ni+Zn (20,84 %), respecto del control. Solo para el tratamiento con Zn, se observó un aumento de la actividad de SOD sin el agregado de nutrientes, respecto del tratamiento con nutriente. El agregado de Zn, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, provocó una disminución significativa (32 % aprox.) de la actividad de SOD respecto del tratamiento con la combinación de Cr+Ni. La actividad

de POD en parte aérea, disminuyó significativamente en los tratamientos con Ni (30,41 %) y Cr+Ni (24,03 %) y aumentó significativamente en los tratamientos con Zn (23,68 %) y Cr+Ni+Zn (11,00 %), en ausencia de nutrientes, respecto del control. En cuanto a los tratamientos con agregado de nutrientes, los tratamientos con Ni y Cr+Ni presentaron una disminución significativa (28,92 % y 19,73 %, respectivamente) respecto del control. Mientras que contrariamente, los tratamientos con Zn y Cr+Ni+Zn incrementaron la actividad de POD en un 23,68 % y un 11,00 %, respectivamente, respecto del control. Cabe destacar que el agregado de Zn en el tratamiento Cr+Ni+Zn, presentó un aumento significativo (58,55 y 45,21 %, respectivamente), respecto de los tratamientos con Ni y Cr+Ni. La actividad de GR disminuyó significativamente, en los tratamientos sin nutrientes con Cr (15,37 %), Ni (35,79 %) y Cr+Ni (23,18 %), mientras que un aumento significativo se observó para los tratamientos con Zn (11,00 %), Cr+Ni+Zn (30,68 %), respecto del control. En los tratamientos con nutrientes, se observó una disminución de la actividad de GR en 34,15 % (tratamiento con Ni) y en 14,75 % (tratamiento con Cr+Ni) y un aumento significativo de la actividad en 14,79 % (tratamiento con Zn) y en 44,22 % (tratamiento con Cr+Ni+Zn), respecto del control. La presencia de Zn (tratamiento Cr+Ni+Zn), incrementó entre un 17,85 y 103,54 % la actividad de GR, respecto de los demás tratamientos, en ausencia de nutrientes. Mientras que en presencia de nutrientes, el tratamiento con Cr+Ni+Zn presentó un aumento significativo de la actividad de GR entre un 25,63 y 119,03 %, respecto de los demás tratamientos.

En raíz, la actividad de CAT disminuyó significativamente en los tratamientos de Ni (30,86 %) y Cr+Ni (26,46 %), respecto del control, en ausencia de nutrientes. En presencia de nutrientes, los tratamientos con Ni y Cr+Ni presentaron una disminución de la actividad de CAT en un 28,74 y 24,46 %, respectivamente, respecto del control. En el tratamiento de Cr+Ni+Zn se observó un aumento significativo de la actividad de CAT en un 30,86 y 23,03 % respecto de los tratamientos con Ni y Cr+Ni, respectivamente, en ausencia de nutrientes. Mientras que en presencia de nutrientes, el tratamiento de Cr+Ni+Zn presentó un aumento significativo de la actividad de CAT en un 40,80 y 32,81 % respecto de los tratamiento con Ni y Cr+Ni, respectivamente. La actividad de SOD incrementó significativamente (entre un 18,00 y 173,68 %) para todos los tratamientos, en ausencia de nutrientes, respecto del control. Mientras que en presencia de nutrientes, se observó un aumento significativo de la actividad de SOD (entre un 64,72 y 170,96 %) para todos los tratamientos a excepción del de Zn, respecto del control. El tratamiento con Cr+Ni+Zn, en ausencia de nutrientes, presentó una actividad significativamente menor (entre un 14,10 y 45,05 %) de SOD, en comparación con los tratamientos de Cr, Ni y Cr+Ni, pero mayor (27,48 %) respecto del tratamiento con Zn. En presencia de nutrientes, en el tratamiento con Cr+Ni+Zn se observó una disminución de la actividad de SOD (entre un 12,00 y 46,25 %) respecto de los tratamientos con Cr, Ni y Cr+Ni. La actividad de POD disminuyó

significativamente en un 32,14 %, 59,44 % y 58,11 % en los tratamientos de Cr, Ni y Cr+Ni, en ausencia de nutrientes, respecto del control. En presencia de nutrientes, se observó que los tratamientos con Cr, Ni y Cr+Ni presentaron una disminución de la actividad de POD en un 11,98 %, 54,96 % y 58,11 %, respecto del control. En el tratamiento con Cr+Ni+Zn se observó un aumento significativo de la actividad de POD (entre un 45,31 y 143,11 %) respecto de los tratamientos con Cr, Ni y Cr+Ni, respectivamente, en ausencia de nutrientes. Mientras que en presencia de nutrientes, el tratamiento con Cr+Ni+Zn presentó un aumento significativo de la actividad de POD en un 114,79 y 135,12 %, respecto de los tratamientos con Ni y Cr+Ni, respectivamente. La actividad de GR disminuyó significativamente para los tratamientos, en ausencia de nutrientes, de Ni y Cr+Ni, en un 38,06 y 30,15 %, respectivamente, respecto del control. Mientras que se observó un aumento significativo (52,37 %) de la actividad de GR para el tratamiento con Zn, en ausencia de nutrientes, respecto del control. No existió diferencia significativa en los tratamientos donde se agregó nutrientes, respecto a los que no se les agregó, a excepción del tratamiento de Cr+Ni+Zn, donde el agregado de nutrientes favoreció el incremento de la actividad de GR en un 22,49 %. En presencia de nutrientes, las actividades de GR disminuyeron significativamente entre un 38,99 y 23,62 %, para los tratamientos con Ni y Cr+Ni, en presencia de nutrientes, respecto del control. Mientras que para los tratamientos con Zn y Cr+Ni+Zn, el agregado de nutrientes incrementó la actividad de GR en un 53,37 y 31,84 %, respecto del control. El tratamiento con Cr+Ni+Zn presentó un aumento significativo de la actividad de Gr (76,45 y 56,47 %) respecto de los tratamientos Ni y Cr+Ni, en ausencia de nutrientes. Mientras que en presencia de nutrientes, el tratamiento con Cr+Ni+Zn presentó un aumento significativo de la actividad de GR (28,64 %, 116,09 % y 72,62 %) respecto de los tratamientos con Cr, Ni y Cr+Ni, respectivamente.





**Figura III.4:** Efectos sobre las actividades de las enzimas antioxidantes en *E. crassipes*, expuesta a diferentes tratamientos, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados ± DE.

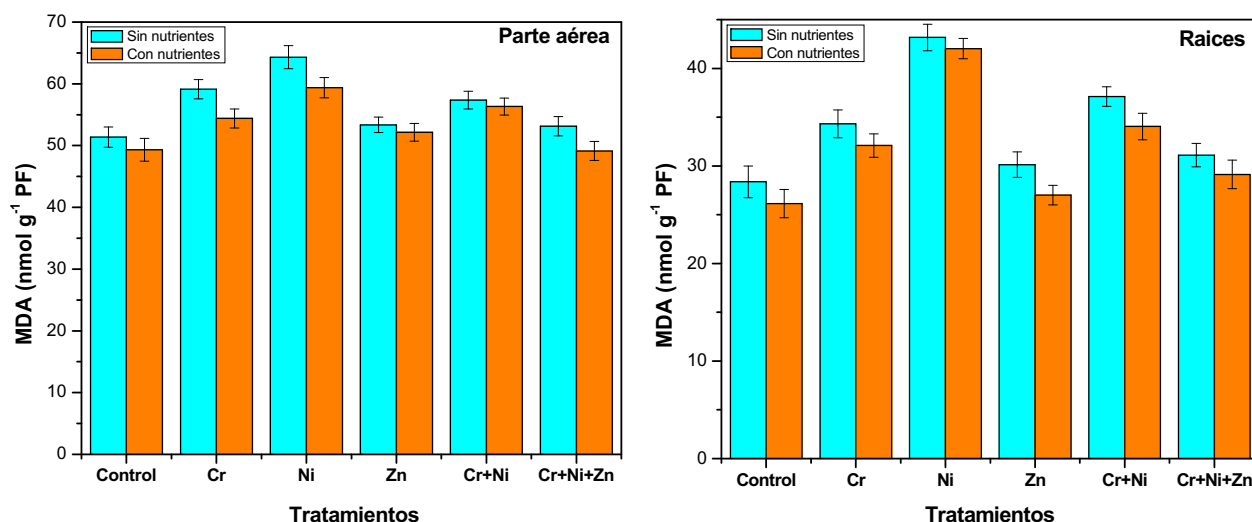
### ***Efectos sobre la peroxidación de lípidos***

En la **Fig. III.5** se puede observar los efectos sobre la concentración de MDA, al exponer a *E. crassipes* a diferentes tratamientos con Cr, Ni y Zn, en presencia y ausencia de nutrientes.

En parte aérea, se observó un aumento de la concentración de MDA, en ausencia de nutrientes, para los tratamientos con Cr, Ni y Cr+Ni, en un 15,13 %, 25,21 % y 12,00 %, respecto del control. Los tratamientos, con agregado de nutrientes presentaron un aumento significativo de la concentración de MDA de un 11,00 % (tratamiento con Cr), 20,38 % (tratamiento con Ni) y 14,20 % (tratamiento con Cr+Ni), respecto del control. Cabe destacar que en el tratamiento con Cr+Ni+Zn, en ausencia de nutrientes, se produjo una disminución significativa de la concentración de MDA en un 13 % (aproximadamente), respecto de los tratamientos con Cr, Ni y Cr+Ni, pero sin diferencia significativa del control. Mientras que en el mismo tratamiento, Cr+Ni+Zn, pero en presencia de nutrientes, se observó una disminución significativa de un 14 % (aproximadamente), respecto de los tratamientos con Cr, Ni y Cr+Ni, pero sin diferencia significativa respecto del control.

En raíz, un aumento de la concentración de MDA se observó para los tratamientos, en ausencia de nutrientes, con Cr (20,96 %), Ni (52,17 %) y Cr+Ni (30,84), respecto del control. Los mismos tratamientos, aún en presencia de nutrientes, presentaron un incremento significativo de la concentración de MDA. El tratamiento con Cr+Ni+Zn presentó una disminución significativa de la concentración de MDA de un 27,94 % (respecto del tratamiento con Ni) y un 16,21 % (respecto del tratamiento con Cr+Ni), en ausencia de nutrientes. Para el mismo tratamiento (Cr+Ni+Zn), pero en presencia de nutrientes, se observó una disminución de la concentración de MDA de un 30,69 % (respecto del tratamiento con Ni) y un 14,43 % (respecto del tratamiento con Cr+Ni), pero sin diferencias significativas sobre el control.





**Figura III.5:** Efectos del Zn sobre la peroxidación de lípidos en *E. crassipes*, en ausencia y presencia de nutrientes, tanto en parte aérea como en raíz. Todos los valores son medias de triplicados  $\pm$  DE.

## 14.2 Discusión Capítulo III

Las concentraciones de Cr y Ni fueron mayores en las raíces que en las partes aéreas, para todos los tratamientos, en concordancia con resultados obtenidos en macrófitas flotantes por otros autores (Banerjee y Sarker, 1997, Hadad y col., 2006, Mufarrege y col., 2010). Como se observó en el Capítulo II, la presencia de nutrientes no afectó la concentración de los metales en la parte aérea, pero si produjo una disminución significativa de la concentración de Cr en la raíz, no así la de Ni. La disminución de la concentración de Cr en raíz, puede explicarse debido a la presencia de P en solución lo cual produce una inhibición de la producción de exudados de ácidos orgánicos y esto disminuiría la formación de complejos con Cr (III) y una menor sorción del mismo por la raíz. Por otro lado, al exponer *E. crassipes* a una combinación de Cr+Ni, se observó que la concentración de Cr en partes aéreas no fue afectada, mientras que la de Ni disminuyó en ausencia de nutrientes, respecto de los tratamiento con metales aislados. Son muy pocos los trabajos de investigación donde se evalúe la combinación de contaminantes y mucho menos de metales pesados (Chaoui y col., 1997, Aravin y Prasad, 2004, Montvydiene y Marciulioniene, 2007, Kaur y col., 2009, Qian y col., 2009). La disminución de la concentración de Ni en la parte aérea puede ser motivo de la disminución de la concentración observada también en la raíz, lo cual disminuiría la translocación del mismo. Así como se observó una disminución de la concentración de Ni en raíz, también se produjo para Cr, en el tratamiento de Cr+Ni, respecto de los tratamientos con metales aislados. Sabemos que el Cr se conjuga a ácidos orgánicos para formar complejos y así ser sorbido por la planta, pero también el Ni se conjuga con ácido cítrico y málico, los cuales proporcionan una fuente de protones para solubilizar y quelar los iones Ni. Esta situación produciría una competencia entre los metales lo cual disminuiría la sorción por *E. crassipes*,

obteniéndose una menor concentración del metal en raíz. De la misma manera que en Cr, la presencia de nutrientes al disminuir la exudación de ácidos orgánicos, produce una menor sorción de Ni. Ahora, al analizar el tratamiento Cr+Ni+Zn, observamos que las concentraciones de Cr y Ni disminuyen significativamente en parte aérea (sin diferir en ausencia y presencia de nutrientes) y raíz (presentando una mayor disminución en presencia de nutrientes), respecto de los tratamientos con metales aislados. Aquí observamos que la presencia de Zn disminuyó la sorción de los otros dos metales, siendo esto reportado también por Kaur y col. (2009). Los mismos expusieron *Brassica juncea* a combinaciones binarias de Zn con Cr, Ni, Co y Cu, encontrando que la combinación disminuyó la toma de los demás metales pesados en comparación a la sorción observada en forma aislada. La inhibición mutua de la sorción de metales, puede atribuirse a las interacciones competitivas. Además, la interacción de metales con las membranas celulares biológicas de la raíz, influye en el medio de transporte, la química, bioacumulación y toxicidad relativa del metal (Dirilgen, 2001). Los metales reaccionan con diversos grupos funcionales tales como sulfhidrilos, carboxilos, ácidos orgánicos, etc. complicando así el desarrollo de una relación general entre la química acuosa de metales y su interacción. De similar manera, Symeonidis y Karataglis (1992) reportaron que se produjo una disminución de la sorción de Pb en presencia de Zn en *Holcus lanatus*.

En cuanto a los efectos de la exposición sobre los parámetros fotosintéticos, la presencia aislada de los metales produjeron los mismos efectos que se observaron en el Capítulo II. Ahora bien, al exponer *E. crassipes* a una combinación de Cr+Ni, se observó una disminución de las concentraciones de clorofilas y carotenoides, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, respecto del control. Sin embargo, la presencia de nutrientes provocó un incremento en la actividad fotosintética (Cl *a* y carotenoides), respecto del tratamiento en ausencia de nutrientes, observada en el aumento de la concentración de Cl *a* y carotenoides, lo cual era de esperar, ya que el enriquecimiento del medio con nutrientes, mejora el crecimiento y desarrollo de las plantas (**Introducción, Capítulo II**). Aun así, es de destacar que en el tratamiento Cr+Ni+Zn se observó un incremento de la concentración de clorofilas y carotenoides, tanto en ausencia como en presencia de nutrientes, lo cual estaría relacionado con la idea de que metales pesados pueden conferir un incremento de la tolerancia. Recientes estudios han demostrado un incremento de la tolerancia a estrés biótico por metales pesados, especialmente a plagas e insectos (Poschenrieder y col., 2006, Noret y col., 2007, Rathinasabapathi y col., 2007, Chmielowska y col., 2010). Por ejemplo, la aplicación de cobre puede brindar a plantas de pimienta un incremento de la capacidad de defensa ante patógenos vasculares (Chmielowska y col, 2010). Sin embargo, poco se conoce sobre la respuesta de defensa, mediada por metales pesados a estrés por metales pesados. Sin embargo, similares resultados fueron observados por Aravin y Prasad (2004), los cuales reportaron

que la aplicación de Zn protegió los cloroplastos y las funciones fotoquímicas asociadas, del estrés producido por Cd en hojas de *Ceratophyllum demersum*.

La respuesta de la defensa enzimática antioxidante ante la exposición a metales pesados en forma aislada que se observó, fue similar a la encontrada en el **Capítulo II**. Mientras que en el tratamiento con combinación de metales (Cr+Ni) se observó un aumento de la actividad de SOD y una disminución significativa de CAT, POD y GR. No podemos hablar de un efecto sinérgico ya que sería necesario realizar más estudios comparativos, pero si cotejamos las actividades del tratamientos Cr+Ni con las observadas en las exposiciones con metales aislados, podemos concluir que este efecto está relacionado marcadamente con el efecto provocado por el Ni en forma aislada. La presencia de nutrientes en dicho tratamiento no provocó cambios sobre las actividades enzimáticas, concluyendo que el agregado de nutrientes (en esa concentración) no sería beneficioso para la planta. En el tratamiento con Cr+Ni+Zn, podemos observar, tanto en presencia como en ausencia de nutrientes, un aumento de la actividad de SOD y un aumento de las actividades de CAT, POD y GR, respecto del tratamiento binario. Una razón de esta respuesta puede ser debido al hecho de que dos enzimas claves del sistema de defensa antioxidante, la SOD extra e intra celular, requiere iones Zn para su actividad (León y col., 2002). Similares respuestas fueron observadas por Zhao y col. (2005), quienes reportaron que el agregado de Zn en la exposición de *Triticum aestivum* a Cd, produjo una reducción significativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MDA y un aumento de las actividades de enzimas antioxidantes. Bajas concentraciones de Zn, inducen la producción de ROS, este “evento de señalización” puede activar el sistema de defensa antioxidante en las plantas (Liu y col., 2013). Esta activación produce una disminución del daño celular provocado por las moléculas de ROS, lo cual se observó en las concentraciones de MDA, tanto en parte aérea como en raíz. Dichas concentraciones disminuyeron en comparación al tratamiento binario (Cr+Ni), tanto en presencia como en ausencia de nutrientes. Wu y Zhang (2002) también encontraron que el incremento de la aplicación de Zn podría aliviar el estrés por Cd en cebada, mejorando el crecimiento y la reducción del daño a membranas.

Los aspectos de interacción y fitotoxicidad de mezclas de metales son procesos muy complejos (Taylor, 1989). La exploración de los mecanismos bioquímicos y moleculares por los que las plantas toleran una exposición a mezclas de metales, conduce a una comprensión de la plasticidad de las vías metabólicas y sus límites de funcionalidad, que es esencial desde un punto de vista práctico en la optimización de la fitorremediación. Sin embargo, las plantas superiores no se utilizan muy a menudo en tales experimentos debido al alto grado de complejidad, por el contrario los modelos utilizando algas se han empleado ampliamente para examinar las interacciones entre los metales pesados (Visviki y Rachlin, 1991, Rachlin y Grosso, 1993).

## **CONCLUSIONES**

## 15 CONCLUSIONES

Las macrófitas son importantes acumuladoras de metales pesados debido a su alta productividad y capacidad de retención en sus raíces. En esta tesis, *E. crassipes* demostró capacidad para sorber Cr (III), Ni (II) y Zn (II). La mayor acumulación se produjo en raíces, tanto cuando fue expuesta a metales pesados en forma aislada y combinada. Principalmente esta acumulación se produjo en las primeras 24 hs. Hubo siempre un aumento de la concentración de los metales en los tejidos de las plantas con el aumento de la concentración del metal en agua y los tiempos de exposición.

La translocación de metales hacia las partes aéreas fue restringida, sin embargo se observaron efectos sobre la concentración de clorofila y carotenoides, demostrándose la sensibilidad de *E. crassipes* a la toxicidad por metales pesados a las concentraciones ensayadas. En el caso del Cr (III) se observó un aumento de las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos, mientras que el Zn (II) no produjo efecto y el Ni (II) presentó un efecto más inhibitorio sobre el aparato fotosintético.

La presencia de metales pesados en las plantas produjo efectos sobre el sistema enzimático antioxidante, que actúa sobre el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas por la presencia de un estrés oxidativo. *E. crassipes* tuvo la capacidad de incrementar rápidamente la respuesta de su defensa enzimática antioxidante, para asegurar su homeostasis redox. Esto se observó cuando fue expuesta a cortos tiempos de exposición para los tres metales pesados. Sin embargo, la inestabilidad del balance redox puede producir daño a nivel de las membranas celulares llamado peroxidación lipídica. A pesar de la rápida respuesta, *E. crassipes* mostró daño a nivel de las membranas celulares para las más altas concentraciones de metales y mayores tiempos de exposición, observado por el aumento de la concentración de malondialdehído (MDA).

Se ha demostrado que el enriquecimiento con nutrientes mejora la tolerancia de las macrófitas a los metales y por lo tanto permitiría el desarrollo de la vegetación en los humedales artificiales en las concentraciones de metales que de otro modo causarían su muerte. Por ello, en siguientes experimentos se expuso a *E. crassipes* a las mismas concentraciones que las que se habían ensayado pero agregando nutrientes (P y N) para poder evaluar los efectos sobre la sorción de los metales y los parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo. Se concluyó que la presencia de nutrientes afectó la sorción de los metales pesados: disminuyendo la concentración de Cr en raíz, sin afectar la concentración en parte aérea; disminuyendo la concentración de Zn en parte aérea y en raíz y por último sin afectar la sorción de Ni. Por otro lado, el agregado de nutrientes favoreció el sostenimiento o continuidad de la actividad fotosintética, observado en el aumento de las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos. A nivel bioquímico, los nutrientes favorecieron la respuesta de *E. crassipes* para tolerar el estrés oxidativo ante la exposición a las menores concentraciones de metales pesados ensayadas, aumentando las

actividades de las enzimas antioxidantes. Los resultados obtenidos permitieron observar que la presencia de nutrientes favorecería la tolerancia de *E. crassipes* a nivel fisiológico, pero no así a nivel enzimático.

A la luz de estos resultados, en un último experimento se expuso *E. crassipes* a la combinación de metales pesados, en presencia tanto de nutrientes como de Zn. La bibliografía sugiere que la suplementación con Zn, en exposiciones combinadas de metales pesados, cumple una función protectora en las plantas ante el estrés oxidativo ocasionado por otros metales pesados. Los resultados demostraron que la presencia de Zn en el tratamiento combinado de Cr+Ni+Zn, disminuyó la sorción de los otros metales. Esta respuesta probablemente se debió directamente por competencia en la sorción o indirectamente por disminución de la exudación de ácidos orgánicos, los cuales forman complejos con Cr (III) y Ni (II) para ser sorbidos. Por último, la presencia de Zn, en el tratamiento combinado, favoreció el incremento de las actividades de las enzimas antioxidantes, permitiendo observar un menor daño celular por la disminución de la concentración de MDA.

Los resultados obtenidos permitieron responder cuales son los efectos sobre los parámetros fisiológicos y de estrés oxidativo que se producen en *E. crassipes* cuando es expuesta a Cr (III), Ni (II) y Zn (II). Se pudo observar que *E. crassipes* tiene la capacidad de incrementar en cortos tiempos de exposición, su respuesta enzimática antioxidante ante la presencia de metales pesados. Esto demuestra una alta plasticidad por parte de *E. crassipes*. Por otro lado, el agregado de nutrientes favorecería la continuidad de la actividad fotosintética, mientras que la presencia de metales pesados (como Zn) a bajas concentraciones permitiría el incremento en la capacidad de la respuesta enzimática antioxidante, permitiendo un menor daño oxidativo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 16 BIBLIOGRAFÍA

### 16.1 Trabajos aceptados para su publicación

- Aebi, H. (1984) *Catalase in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121 - 126.
- Alexander, D.E. (1999) *Bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification*. *Environ. Geology. Encyclopedia of Earth Science*, pp 43 - 44.
- Ali, M.M. y Soltan, M.E. (1999) *Heavy metals in aquatic macrophytes, water and hydrosols from the river Nile, Egypt*. *J. Union Arab. Biol. Cairo* 9: 99 - 115.
- Alves, E.; Cardoso, L.R.; Scavroni, J.; Ferreira, L.C.; Boaro, C.S.F y Cataneo, A.C. (2003) *Physiological and biochemical evaluations of water hyacinth (Eichhornia crassipes), cultivated with excessive nutrient levels*. *Planta Daninha* 21: 27 -35.
- Alves, E.; Cardoso, L.R.; Scavroni, J.L.R.; Ferreira, L.C., Boaro, C.S.F. y Cataneo, A.C. (2003) *Avaliações fisiológicas e bioquímicas de plantas de aguapé (Eichhornia crassipes) cultivadas com níveis excessivos de nutrientes*. *Planta Daninha, Viçosa-MG*. 21: 27 - 35.
- Apel, K. y Hirt, H. (2004) *Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373 - 399.
- Arasimowicz, M. y Floryszak-Wieczorek, J. (2007) *Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses*. *Plant Science* 172: 876 - 887.
- Aravind, P. y Prasad, M.N.V. (2003) *Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in Ceratophyllum demersum L.: a free floating freshwater macrophyte*. *Plant Physiol. Biochem* 41: 391 - 397.
- Aravind, P. y Prasad, M.N.V. (2004) *Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed Ceratophyllum demersum L.: a freshwater macrophyte*. *Plant Sci.* 166: 1321 - 1327.
- Aravind, P. y Prasad, M.N.V. (2005) *Modulation of cadmium-induced oxidative stress in Ceratophyllum demersum by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism*. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 107 - 116.
- Aravind, P.; Prasad, M.N.V.; Malec, P.; Waloszek, A. y Strzalka, K. (2009) *Zinc protects Ceratophyllum demersum L. (free-floating hydrophyte) against reactive oxygen Species induced by cadmium*. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 23: 50 - 60.



- Arnon, D.I. (1949) *Copper enzyme in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24: 1 - 15.
- Artetxe, U.; García-Plazaola, J.I.; Hernández, A. y Becerril, J.M. (2002) *Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd*. Plant Physiol. Biochem. 40: 859 - 863.
- Aruoma, O.I.; Halliwell, B.; Laughton, M.J.; Quinlan, G.J. y Gutteridge, J.M.C. (1989) *The mechanism of initiation of lipid-peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II)-iron (III) complex*. Biochem. J. 258: 617 - 620.
- Baccouch, S.; Chaoui, A. y El Ferjani, E. (1998) *Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in Zea mays shoots*. Plant. Physiol. Biochem. 36: 689 - 694.
- Bailey-Serres, J. y Mittler, R. (2006) *The roles of reactive oxygen species in plant cells*. Plant Physiol. 141: 131.
- Baker, A.J.M. (1981) *Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals*. J. Plant Nutr. 3: 643 - 654.
- 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.
- Barker, A.V. (1989) *Genotypic response of vegetable crops to nitrogen nutrition*. Hortscience 24: 584 - 591.
- Barrett, S.C.H. y Forno, I.W. (1982) *Style morph distribution in New World populations of Eichhornia crassipes (Mart.) Solms-Laubach (water hyacinth)*. Aquatic Botany 13: 299 - 306.
- Barton, L.L.; Johnson, G.V.; O’Nan, A.G. y Wagener, B.M. (2000) *Inhibition of ferric chelate reductase in alfalfa roots by cobalt, nickel, chromium, and copper*. J Plant Nutr 23: 1833 - 1845.
- Berlett, B.S. y Stadtman, E.R. (1997) *Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress*. J. Biol. Chem. 271: 20313 - 20316.
- Beyer, W.F. y Fridovich, I. (1987) *Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions*. Analyt. Biochem. 161: 559 - 566.
- Bian, J.; Berninger, J.P.; Fulton, B.A. y Brooks, B.W. (2013) *Nutrient stoichiometry and concentrations influence silver toxicity in the aquatic macrophyte Lemna gibba*. Sci. Total Environ. 449: 229 - 236.
- Blokhina, O.; Virolainen, E. y Fagerstedt, K.V. (2003) *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review*. Ann. Bot. 91: 179 - 194.
- Bonet, A.; Poschenrieder, C. y Barcelo, J. (1991) *Chromium III ion interaction in Fe deficient and Fe sufficient bean plants. I. Growth and Nutrient content*. J. Plant Nutr. 14: 403 - 414.

- Boominathan R., Doran, P.M. (2002) *Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyper-accumulator, Alyssum bertolonii*. *New Phytol.* 156: 205 - 254.
- Bowler, C.; Montagu, M.V. y Inzé, D. (1992) *Superoxide dismutase and stress tolerance*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83 - 116.
- Boyd, C. E. (1976) *Accumulation of dry matter N and P by cultivated water hyacinths*. *Economic Botany* 30: 51 - 56.
- Bradford, M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem.* 72: 248 - 254.
- Bradley, R.; burt, A.J. y Read, D.J. (1981) *Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in Calluna vulgaris*. *Nature* 292: 335 -337.
- Bradley, R.; Burt, A.J. y Read, D.J. (1982) *The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. VIII. The role of mycorrhizal infection in heavy metal resistance*. *New Phytol.* 91: 197 - 209.
- Brain, R.A. y Cedergreen, N. (2009) *Biomarkers in aquatic plants: selection and utility*. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 198: 49 - 109.
- Briat, J.F. (2002) *Metal ion-activated oxidative stress and its control*. In: Inze, D. and Montagu, M.V. (Eds.). *Oxidative Stress in Plants*. New York: Taylor and Francis. pp. 171 - 189.
- Briat, J.F. y Lebrun, M. (1999) *Plant responses to metal toxicity*. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences* 3: 43 - 54.
- Brix, H. (1997) *Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands?* *Wat. Sci. Tech.* 35: 11 - 18.
- Broadley, M.R.; White, P.J.; Hammond, J.P.; Zelko, I. y Lux A. (2007) *Zinc in plants*. *New Phytologist* 173: 677 - 702.
- Cairney, J.W.G. y Meharg, A.A. (2003) *Ericoid mycorrhizal: a partnership that exploits harsh edaphic conditions*. *European J. of Soil Sci.* 54: 735 - 740.
- Cakmak, I. (2000) *Possible role of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species*. *New Phytol.* 146: 185 - 205.
- Cakmak, I. y Marschner, H. (1988) *Zinc-dependent changes in ESR signals, NADPH oxidase and plasma membrane permeability in cotton roots*. *Physiol. Plant.* 73: 182 - 186.
- Calabrese, E.J. y Baldwin, L.A. (2003a) *Toxicology rethinks its central belief: hormesis demands a reappraisal of the way risks are assessed*. *Nature* 421: 691 - 692.
- Calabrese, E.J. y Baldwin, L.A. (2003b) *The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology*. *Toxicol. Sci.* 71: 246 - 250.

- Caldelas, C.; Iglesia-Turiño, S.; Araus, J.L.; Bort, J. y Febrero, A. (2009) *Physiological responses of Eichhornia crassipes (Mart.) Solms to the combined exposure to excess nutrients and Hg*. Braz. J. Plant Physiol. 21: 1 - 12.
- Campanella, M.V.; Hadad, H.; Maine, M.A. y Markariani, R. (2005) *Effects of phosphorous from a sewage effluent on internal and external morphology of Eichhornia crassipes (Mart. Solms.) in a constructed wetland*. Limnetica 24: 263 - 272.
- Castiglione, S.; Franchin, C.; Fossat, T.; Lingua, G.; Torrigiani, P. y Biondi, S. (2007) *High zinc concentrations reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (Populus alba L. cv. Villafranca)*. Chemosphere 67: 1117 - 1126.
- Cervantes, C.; Campos-García, J.; Devars, S.; Gutiérrez-Corona, F.; Loza-Tavera, H.; Torres-Guzmán, J.C. y Moreno-Sanchez, R. (2001) *Interactions of chromium with microorganisms and plants*. FEMS Microbiology Reviews 25: 335 - 347.
- Chaoui, A.; Ghorbal, M.H. y El Ferjani, E. (1997) *Effects of cadmium-zinc interactions on hydroponically grown vean (Phaseolus vulgaris L.)*. Plant Sci. 126: 21 - 28.
- Chatterjee, J. y Chatterjee, C. (2000) *Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in Cauliflower*. Aquarion Pollut. 109: 69 - 74.
- Chen, C.; Huang, D. y Liu, J. (2009) *Functions and toxicity of nickel in plants: Recent advances and future prospects*. Clean 37: 304 - 313.
- Cherif, J.; Mediouni, C.; Ben Ammar, W. y Jemal, F. (2011) *Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (Solanum lycopersicum)*. J. Environ. Sci. (China) 23: 837 - 844.
- Chmielowska, J.; Veloso, J.; Gutiérrez, J.; Silvar, C. y Días, J. (2010) *Cross-protection of pepper plants stressed by copper against a vascular pathogen is accompanied by the induction of a defence response*. Plant Sci. 178: 176 - 182.
- Clijsters, H.; Cuypers, A. y Vangronsveld, J. (1999) *Physiological response to heavy metals in higher plants; defence against oxidative stress*. Zeitschrift fur Naturforsch 54: 730 - 734.
- Corpas, F.J.; Barroso, J.B y del Río, L.A. (2001) *Peroxisomes as a source of reactive oxygen Species and nitric oxide signal molecules in plant cells*. Trends Plant Sci. 6: 145 - 150.
- Cuypers, A.; Vangronsveld, J. y Clijsters, H. (2001) *The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in root and primary leaves of Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. Biochem., 39: 657 - 664.
- del Río, L.A.; Sandalio, L.M.; Corpas, F.J.; Palma, J.M. y Barroso, J.B. (2006) *Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signalling*. Plant Physiol. 141: 330 - 335.

- del Río, L.A.; Sandalio, L.M.; Palma, J.M.; Gómez, M. y Barroso, J.B. (2002) *Reactive oxygen Species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes*. J. Exp. Bot. 53: 1255 - 1272.
- Delgado, M.; Bigeriego, M. y Guardiola, E. (1993) *Uptake of Zn, Cr and Cd by water hyacinths*. Wat. Res. 27: 269 - 270.
- Deng, H.; Ye, 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. Pollut. 132: 29 - 40.
- Desougi, L.A. (1984) *Mineral nutrient demands of the water hyacinth [Eichhornia crassipes (Mart.) Solms] in the White Nile*. Hydrobiologia 110: 99 - 108.
- Di Luca, G.A.; Hadad, H.R.; Mufarrege, M.M.; Maine, M.A. y Sánchez, G.C. (2014) *Improvement of Cr phytoremediation by Pistia stratiotes in presence of nutrients*. Int. J. Phytoremediation 16: 167 - 178.
- Di Luca, G.A.; Maine, M.A.; Mufarrege, M.M.; Hadad, H.R.; Sánchez, G.C. y Bonetto, C. (2011b) *Metal retention and distribution in the sediment of a constructed wetland for industrial wastewater treatment*. Ecol. Eng. 37: 1267 - 1275.
- Di Luca, G.A.; Mufarrege, M.M.; Sánchez, G.C.; Hadad, H.R. y Maine, M.A. (2011a) *P distribution in different sediment fraction of a constructed wetland*. Water Sci. Tech. 63: 2364 - 2380.
- Dirilgen, N. (2001) *Accumulation of heavy metals in freshwater organisms: Assessment of toxic interactions*. Turkish Journal of Chemistry 25: 173 - 179.
- Doganlar, Z.B.; Cakmak, S. y Yanik, T. (2012) *Metal uptake and physiological changes in Lemna gibba exposed to manganese and nickel*. Intern. J. Biology 4: 148 - 157.
- Downing, J.A.; Osenberg, C.W. y Sarnelle, O. (1999) *Meta-analysis of marine nutrient-enrichment experiments: variation in the magnitude of nutrient limitation*. Ecology 80: 1157 - 1167.
- Drażkiewicz, M. y Baszyński, T. (2005) *Growth parameters and photosynthetic pigments in leaf segments of Zea mays exposed to cadmium, as related to protection mechanisms*. J Plant Physiol 162: 1013 - 1021.
- Drzewiecka, K.; Mleczek, M., Gąsecka, M.; Magdziak, Z. y Goliński, P. (2012) *Changes in Salix viminalis L. cv. 'Cannabina' morphology and physiology in response to nickel ions – Hydroponic investigations*. J. Hazard. Mat. 217: 429 - 438.
- Duffus, J.H. (2002) *"Heavy metals" - A meaningless term? (IUPAC Technical report)*. Pure Appl. Chem. 74: 793 - 807.

- Duman, F. y Ozturk, F. (2010) *Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (Nasturtium officinale R. Br.)*. J. Environ. Sci. 22: 526 - 532.
- Ebel, M.; Evangelou, M.W.H. y Schaeffer, A. (2007) *Cyanide phytoremediation by water hyacinth (Eichhornia crassipes)*. Chemosphere 66: 816 - 823.
- Edwards, E.A.; Rawsthorne, S. y Mullineaux, P.M. (1990) *Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (Pisum sativum L.)*. Planta 180: 278 - 284.
- El-Bassam, N. (1978) *Spurenelemente: Nährstoffe und Gift zugleich*. Kali-Briefe 14: 255 - 272.
- Eskew, D.L.; Welch, R.M. y Cary, E.E. (1983) *Nickel and essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants*. Science 222: 691 - 693.
- Facetti, J.; Dekov, V.M. y Grieken, R.V. (1998) *Heavy metals in sediments of Paraguay river. A preliminary study*. Sci. Total Environ. 209: 79 - 86.
- Förstner, U. y Wittmann, G.T.W. (1983) *Metal pollution in the aquatic environment*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg, New York. pp 481.
- Fox, L.J., Struik, P.C., Appleton, B.L., Rule, J.H., 2008. *Nitrogen Phytoremediation by water hyacinth (Eichhornia crassipes (Mart.) Solms)*. Water Air Soil Pollut 194, 199-207.
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2005) *Redox homeostasis and antioxidant signalling. A metabolic interface between stress perception and physiological responses*. Plant Cell 17: 1866 - 1875.
- Gajewska, E. y Sklodowska, M. (2005) *Antioxidative responses and proline level in leaves and roots of pea plants subjected to nickel stress*. Acta Physiol. Plant. 27: 329 - 339.
- Gajewska, E. y Sklodowska, M. (2007) *Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves*. Biometals 20: 27 - 36.
- Gajewska, E.; Sklodowska, M.; Slaba, M. y Mazur, J. (2006) *Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots*. Biol. Plant 50: 653 - 659.
- Gardea-Torresdey, J.L.; Peralta-Videa, J.R.; de la Rosa, G. y Parsons, J.G. (2005) *Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy*. Coord. Chem. Rev. 249: 1797 - 1810.
- Giannopolitis, C.N. y Ries S.K. (1977) *Superoxide Dismutase. Occurrence in Higher Plants*. Plant Physiology 59: 309 - 314.
- Gianquinto, G.; Abu-Rayyan, A.; Di Tola, L.; Piccotino, D. y Pezzarossa, B. (2000) *Interaction Effects of phosphorus and zinc on photosynthesis, growth and yield of dwarf bean grown in two environments*. Plant Soil 220: 219 - 228.

- Goel, P.K.; Khatavkar, S.D. y Kulkarni, A.Y. (1989) *Chemical composition and concentration factors of water hyacinth (Eichhornia crassipes) growing in a shallow polluted pond*. Int. Ecol. Environ. Sci. 15: 141 - 144.
- Gonnelli, C.; Galardi, F. y Gabbrielli, R. (2001) *Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of Silene paradoxa*. Physiol. Plant. 113: 507 - 514.
- González, C.I.; Maine, M.A.; Cazenave, J.; Sanchez, G.C y Benavides, M.P. (2015) *Physiological and biochemical responses of Eichhornia crassipes exposed to Cr (III)*. Environ. Sci. Pollut. Res. 22: 3739 - 3747.
- Gopal, R.; Mishra, K.B.; Zeeshan, M.; Prasad, S.M. y Joshi, M.M. (2002) *Laser induced chlorophyll fluorescence spectra of mung plants growing under nickel stress*. Curr. Sci. 83: 880 - 884.
- Göthberg, A.; Greger, M.; Holm, K. y Bengtsson, B. (2004). *Influence of nutrient levels on uptake and effects of mercury, cadmium, and lead in water spinach*. J. Environ. Quality 33: 1247 - 1255.
- Gratão, P.L.; Polle, A.; Lea, P.J. y Azevedo, R.A. (2005) *Making the live of heavy metal-stressed plants a little easier*. Funct. Plant Biol. 32: 481 - 494.
- Grierson, P. (1992) *Organic acids in the rhizosphere of Banksia integrifolia Lf*. Plant Soil 144: 259 - 265.
- Hadad, H. y Maine, M.A. (2001) *Efectos del fósforo sobre el crecimiento y competencia de Salvinia herzogii de la Sota (Salviniaceae) y Pistia stratiotes L. (Araceae)*. FABICIB 5: 49 - 56.
- Hadad, H.; Maine, M.A. y Bonetto, C. (2006) *Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment*. Chemosphere 63: 1744 - 1753.
- Hadad, H.R.; Maine, M.A.; Mufarrege, 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. Hazard 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*. Ecolog. Eng. 31: 122 - 131.
- Hadad, H.R.; Mufarrege, M.; Pincioli, M.; Di Luca, G.A. y Maine, M.A. (2010) *Morphological response of Typha domingensis to an industrial effluent containing heavy metals in a constructed wetland*. Archiv. Environ. Contam. Toxicol. 58: 666 - 675.
- Hall, J.L. (2002) *Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance*. J. Exp. Bot. 53: 1 -11.
- Hammad, D.M. (2011) *Cu, Ni and Zn phytoremediation and translocation by water hyacinth plant at different aquatic environments Australian*. J. Basic App. Sci. 11: 11 - 22.

- Hasan, S.H.; Talat, M. y Rai, S. (2007) *Sorption of Cadmium and Zinc from Aqueous Solutions by Water Hyacinth (Eichhornia Crassipes)*. Biores. Technol. 98: 918 - 928.
- Hassan, M.J.; Wang, F.; Ali, S. y Zhang, G. (2005) *Toxic effect of cadmium on rice as affected by nitrogen fertilizer form*. Plant Soil 277: 359 - 365.
- Heath, R.L. y Packer, L. (1968) *Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation*. Archives Bioch. Bioph. 125: 189 - 198.
- Hechmi, N.; Aissa, N.B. y Abdenaceur, H. (2014) *Phytoremediation efficiency of a pcp-contaminated soil using four plant species as mono-and mixed cultures*. Int. J. Phytoremediation 16: 1241 - 1256.
- Hoagland, D.R. y Arnon, D.I. (1950) *The water-culture method for growing plants without soil*. California Agricul. Exp. Station Circular. 347: 1 - 32.
- Hodges, D.M.; DeLong, J.M.; Forney, C.F. y Prange, R.K. (1999) *Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds*. Planta 207: 604 - 611.
- Hou, W.; Chen, X.; Song, G.; Wang, Q. y Chang, C.C. (2007) *Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted water body restoration by duckweed (Lemna minor)*. Plant Physiol. Biochem. 45: 62 - 69.
- Hu, C.; Zhang, L.; Hamilton, D.; Zhou, W.; Yang, T. y Zhu, D. (2007) *Physiological responses induced by copper bioaccumulation in Eichhornia crassipes (Mart.)*. Hydrobiologia 579: 211 - 218.
- Ingole, N.W. y Bhole, A.G. (2003) *Removal of heavy metals from aqueous solution by water hyacinth (Eichhornia crassipes)*. J. Water SRT-Aqua 52: 119 - 128.
- Inzé, D. y Van Montagu, M. (1995) *Oxidative stress in plants*. Current Opinion in Biotech. 6: 153 - 158.
- Inze, D. y Van Montagu, M., 1995. *Oxidative stress in plants*. Current Opinion in Biotechnology 6: 153 - 158.
- Jana, S. (1987) *Accumulation of Hg and Cr by three aquatic species and subsequent changes in several physiological and biochemical plant parameters*. Water Air Soil Poll. 38: 105 - 109.
- Jenssen, P.D.; Mahlum, T. y Krogstad, T. (1993) *Potential use of constructed wetlands for wastewater treatment in northern environments*. Water Sci. Technol. 28: 149 - 157.
- Jócsák, I.; Villányi, V.; Rabnecz, G. y Droppa, M. (2008) *Investigation of nickel stress induction in terms of metal accumulation and antioxidative enzyme activity in barley seedlings*. Acta Biologica Szegediensis. 52: 167 - 171.

- Kaur, R.; Bhardwaj, R. y Thukral, A.K. (2009) *Uptake of heavy metals, and antioxidative enzymes in Brassica juncea L. seedlings as affected by Zn in binary combinations with other heavy metals*. Plant Stress 3: 17 - 25.
- Kelley, C.; Curtis, A.J.; Uno, J.K. y Berman, C.L. (2000) *Spectroscopic studies of the interaction of Eu (III) with the roots of water hyacinth*. Water Air Soil Pollut. 119: 171 - 176.
- Kilham, P. y Hecky, R. (1988) *Comparative ecology of marine and freshwater phytoplankton*. Limnol. Oceanogr. 33: 776 - 795.
- 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.
- Leblebici, Z. y Aksoy, A. (2011) *Growth and Lead Accumulation Capacity of Lemna minor and Spirodela polyrhiza (Lemnaceae): Interactions with Nutrient Enrichment*. Water Air and Soil Pollut. 214: 175 - 184.
- Lee, W. y Wang, W. (2001) *Metal accumulation in the green macroalga Ulva fasciata: effects of nitrate, ammonium and phosphate*. Sci. Tot. Environ. 278: 11 - 22.
- León, A.M.; Palma, J.M.; Corpas, F.J.; Gómex, M.; Romero-Puertas, M.C.; Chatterjee, D.; Mateos, R.M.; del Río, L.A. y Sandalio, L.M. (2002) *Antioxidative enzyme in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium*. Plant Physiol. Biochem. 40: 813 - 820.
- Leyval, C.; Turnau, K. y Haselwandter, K. (1997) *Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects*. Mycorrhiza 7: 139 - 153.
- Li, M.; Hu, C.; Zhu, Q.; Chen, L.; Kong, A. y Liu, Z. (2006) *Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga Pavlova viridis (Prymnesiophyceae)*. Chemosphere 62: 565 - 572.
- Liu, X.M.; Nguyen, X.C.; Kim, K.E.; Han, H.J.; Yoo, J. y Lee K. (2013) *Phosphorylation of the zinc finger transcriptional regulator ZAT6 by MPK6 regulates Arabidopsis seed germination under salt and osmotic stress*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 430: 1054 - 1059.
- Losi, M.E.; Amrhein, C. y Frankenberger, W.T. (1994) *Bioremediation of chromate-contaminated groundwater by reduction and precipitation in surface soils*. J. Environ. Qual. 23: 1141 - 1150.
- Lu, X.; Kruatrachue, M.; Pokethitiyook, P. y Homyok, K. (2004) *Removal of cadmium and zinc by water hyacinth, Eichhornia crassipes*. Science Asia 30: 93 - 103.



- Madhava Rao, K.V. y Sresty, T.V.S. (2000) *Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon-pea (Cajanus cajan (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses*. Plant Sci. 157: 113 - 128.
- Maheshwary, R. y Dubey, R.S. (2009) *Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings*. Plant Growth Regul. 59: 37 - 49.
- 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.; Duarte, M. y Suñe, N. (2001) *Cadmium uptake by floating macrophytes*. Water Res. 5: 2629 - 2634.
- Maine, M.A.; Hadad, H.R.; Sánchez, G.C.; Mufarrege, M.M.; Di Luca, G.A.; Caffaratti, S.E.; Pedro, M.C. (2013) *Sustainability of a constructed wetland faced with a depredation event*. J. Environ. Manage. 128: 1 - 6.
- Maine, M.A.; Panigatti, M.C. y Pizarro, M.J. (1998) *Role of macrophytes in phosphorus removal in Parana medio wetlands*. Polskie Archiwum Hydrobiologii (Polish Archives of Hydrobiology) 45: 23 - 34.
- Maine, M.A.; Suñe, N. 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. (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. y Bonetto, C. (2009) *Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland*. J. Environ. Manag. 90: 355 - 363.
- Malar, S.; Vikram, S.S.; Favas, P.J.C. y Perumal, V. (2014) *Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [Eichhornia crassipes (Mart.)]*. Bot. Stud. 55: 54.
- Maleva, M.G.; Nekrasova, G.F.; Malec, P.; Prasad, M.N.V. y Strzałka, K. (2009) *Ecophysiological tolerance of Elodea canadensis to nickel exposure*. Chemosphere, 77: 392 - 398.
- Mangabeira, P.A.; Ferreira, A.S.; de Almeida, A.A.; Fernandes, V.F.; Lucena, E. Souza, V.L.; dos Santos Júnior, A.J.; Oliveira, A.H.; Grenier-Loustalot, M.F.; Barbier, F. y Silva, D.C. (2011) *Compartmentalization and ultrastructural alterations induced by chromium in aquatic macrophytes*. Biometals 24: 1017 - 1026.

- Mangabeira, P.A.O.; Labejof, L.; Lamperti, A.; Almeida, A.F.; Oliveira, A.H.; Escaig, F.; Severo, M.I.G.; Silva, D.C.; Saloes, M.; Mielke, M.S.; Lucena, E.R.; Martins, M.C.; Santana, K.B.; Gavrillov, K.L.; Galle, P. y Levi-Setti, R. (2004) *Accumulation of chromium in root tissues of Eichhornia crassipes (Mart.) Solms. in Cachoeira river-Brazil*. Appl. Surf. Sci. 231-232: 497 - 501.
- Marschner, H. y Cakmak, I. (1986) Mechanism of phosphorus-induced zinc deficiency in cotton. II. Evidence for impaired shoot control of phosphorus uptake and translocation under zinc deficiency. *Physiol. Plantarum* 68: 491 - 496.
- Mehlhorn, H.; Lelandais, M; Korth, H.G. y Foyer, C.H. (1996) Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letter* 378: 203 - 206.
- Midgley, D.J.; Chambers, S.M. y Cairney, W.G. (2004) *Distribution of ericoid mycorrhizal endophytes and root-associated fungi in neighbouring Ericaceae plants in the field*. *Plant and Soil* 259: 137 - 151.
- Miretzky, P.; Saralegui, A. y Cirelli, A .F. (2004) *Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina)*. *Chemosphere*, 57: 997 - 1005.
- Mishra, V.K. y Tripathi, B.D. (2009) *Accumulation of chromium and zinc from aqueous solutions using water hyacinth (Eichhornia crassipes)*. *J. Hazard Mat.* 164: 1059 - 1063.
- Mishra, V.K.; Upadhyaya, A.R.; Pandey, S.K. y Tripathi, B.D. (2007) *Heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballav Pant Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent*. *Environ. Monit. Assessment* 141: 1 - 3.
- Mitchell, D.S. (1976) *The growth and management of Eichhornia crassipes and Salvinia spp. in their native environment and in alien situations*. In: Varshney, C.K.; Rzoska, J. (eds) *Aquatic weeds in Southeast Asia* 396. Dr. W. Junk, The Hague.
- Mittler, R. (2002) *Oxidative stress antioxidants and stress tolerance*. *Trends Plant Sci.* 7: 405 - 410.
- Møller, I.M., Jensen, P.E. y Hansson, A. (2007) *Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 459 - 481.
- Montvydienė, D. y Marčiulionienė, D. (2007) *Assesment of toxic interaction of metals in binary mixtures using Lepidium sativum and Spirodela polyrrhiza*. *Polish J. of Environ. Stud.* 16: 777 - 783.
- Mufarrege, M.; Di Luca, G.A.; Hadad, H.R. y Maine, M.A. (2011) *Adaptability of Typha domingensis to high pH and salinity*. *Ecotoxicology* 20: 457 - 465.
- Mufarrege, M.; Hadad, H.R. y Maine, M.A. (2010) *Response of Pistia stratiotes to heavy metals (Cr, Ni, and Zn) and phosphorous*. *Arch. Environ. Contam. Toxic.* 58: 53 - 61.

- Mufarrege, M.M.; Hadad, H.R.; Di Luca, G.A. y Maine, M.A. (2014) *Metal dynamics and tolerance of Typha domingensis exposed to high concentrations of Cr, Ni and Zn*. *Ecot. Environ. Saf.* 105: 90 - 96.
- Mullineaux, P.M. y Creissen, G.P. (1997) Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. In: Scandalios, J.G. (ed) *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. pp. 667 - 713.
- Muramoto, S. y Oki, Y. (1983) *Removal of some heavy metals from polluted water by water hyacinth (Eichhornia crassipes)*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 30: 170 - 177.
- Murray, K.S. (1996) *Statistical comparison of heavy metal concentration in river sediment*. *Environ. Geol.* 27: 54 - 58.
- Nakayama, E.; Kuwamoto, T.; Tokoro, H. y Fujinaga, T. (1981) *Dissolved rate of chromium in seawater*. *Nature*, 290: 768 - 770.
- Narang, U.; Thukral, A.K.; Bhardwaj, R. y Garg, S.K. (2008a) *Role of antioxidative defense system in Eichhornia crassipes (Mart.) Solms during phytoremediation of mercury*. *Canadian J. of Pure and Applied Sci.* 2: 537 - 545.
- Narang, U.; Thukral, A.K.; Bhardwaj, R. y Garg, S.K. (2008b) *Glutathione-Ascorbate cycle for phytoremediation of mercury by Eichhornia crassipes (Mart.) Solms*. *Jpn. J. Environ. Toxicol.* 11: 1 - 9.
- Navrot, N.; Roubier, N.; Gelbaye, E. y Jacquot, J-P. (2007) *Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria*. *Physiol. Plant* 129: 185 - 195.
- Newman, M.C. (1998) *Fundamentals of ecotoxicology*. Sleeping Bear/Ann Arbor Press. Chelsea. 402 p.
- Nora, M.Q. y Jesus, R.O. (1997) *Water hyacinth [Eichhornia crassipes (Mart.) Solms-Laub], an alternative for the removal of phenol in wastewater*. *Acta Biol. Venezuelica* 17: 57 - 64.
- Noret, N., Josens, G.; Escarre, J.; Lefe'bvre, C.; Panichelli, S. y Meerts, P. (2007) *Development of Issoria lathonia (Lepidoptera: Nymphalidae) on zinc-accumulating and nonaccumulating Viola species (Violaceae)*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 565 - 571.
- Ochiai, E.I. (1987) *General Principles of Biochemistry of the Elements*. Plenum Press, New York, pp. 227 - 234.
- Odjegba, V.J. y Fasidi, I.O. (2007) *Changes in antioxidant enzyme activities en Eichhornia crassipes (Pontederiaceae) and Pistiastratiotes (Araceae) under heavy metal stress*. *Rev. Biol. Trop.* 55: 815 - 823.
- Oke, O.A. y Elmo, B.O. (1990) *Elemental analysis of water hyacinth growing in the Badagry lagoon of Lagos state, Nigeria*. *Nigerian J. Weed Sci.* 3: 67 - 70.

- O'Keeffe, D.H.; Hardy, J.K. y Rao, R.A. (1984) *Cadmium uptake by the water hyacinth: Effects of solution factor*. Environ. Pollut. UK. 34: 133 - 147.
- Paiva, L.B.; Gonçalves de Oliveira, J.; Azevedo, R.A.; Ribeiro, D.R.; Gomes da Silva, M. y Vitória, A.P. (2009) *Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to Cr<sup>3+</sup> and Cr<sup>6+</sup>*. Environ. Exp. Bot. 65: 403 - 409.
- Panda, S.K. y Choudhury, S. (2005) *Chromium stress in plants*. Braz. J. Plant Physiol. 17: 95 - 102.
- Parida, B.K.; Chhibba, J.M. y Nayyar, V.K. (2003) *Effect of nickel contaminated soil on fenugreek (Trigonella corniculata L.) growth and mineral composition*. Sci Hort 98: 113 - 119.
- Pflugmacher, S. y Steinberg, C.E.W. (1997) *Activity of phase I and phase II detoxification enzymes in aquatic macrophytes*. J. Appl. Bot. 71: 144 - 146.
- Pillay, S.V.; Rao, V.S. y Rao, K.V.N. (1996) *Effect of nickel toxicity in Hyptis suaveolens (L.) Poit. and Helianthus annuus L.* Indian J. Plant Physiol. 1: 153 - 156.
- Poschenrieder, C.; Cabot, C.; Martos, S.; Gallego, B. y Barceló, J. (2013) *Do toxic ions induce hormesis in plants?* Plant Sci. 212: 15 - 25.
- Poschenrieder, C.; Tolrá, R. y Barceló, J. (2006) *Can metals defend plants against biotic stress?* Trends in Plant Sci. 11: 288 - 295.
- Prasad, K.V.S.K., Pardha Saradhi, P. y Sharmila, P. (1999) *Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in Brassica juncea*. Environ. Exp. Bot. 42: 1 - 10.
- Puzon, J.J.; Rivero, G.C. y Serrano, J.E. (2014) *Antioxidant responses in the leaves of mercury-treated Eichhornia crassipes (Mart.) Solms*. Environ. Monit. Assess. 186: 6889 - 6901.
- Qian, H.; Li, J.; Sun, L.; Chen, W.; Sheng, G.D.; Liu, W. y Fu, Z. (2009) *Combined effect of copper and cadmium on Chlorella vulgaris growth and photosynthesis-related gene transcription*. Aquatic Toxicology 94: 56 - 61.
- Rachlin, J.W. y Grosso, A. (1993) *The growth response of the green alga, Chlorella vulgaris to combined divalent cation exposure*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 24: 16 - 20.
- Radic, S.; Stipanicev, D.; Cvjetko, P.; Mikelic, I.L.; Rajcic, M.M.; Sirac, S.; Kozlina, B.P. y Palvica, M. (2010) *Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (Lemna minor L.) as a test organism*. Ecotoxicology 19: 216 - 222.
- Ragsdale, S.W. (1998) *Nickel biochemistry*. Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 208 - 215.
- Randhawa, V.K.; Zhou F.; Jin X.; Nalewayko C. y Kushner, D.J. (2001) *Role of oxidative stress and thiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green alga Scenedesmus acutus f. alternans*. Can. J. Microbiol., 47: 987 - 993.
- Rathinasabapathi, B.; Rangasamy, M.; Froeba, J.; Cherry, R.H.; McAuslane, H.J.; Capinera, J.I.; Srivastava, M. y Ma, L.Q. (2007) *Arsenic hyperaccumulation in the Chinese brake fern*

- (*Pteris vittata*) deters grasshopper (*Schistocerca Americana*) herbivory. *New Phytologist* 175: 363 - 369.
- Reddy, K.R. (1983) *Fate of nitrogen and phosphorus in a waste-water retention reservoir containing aquatic macrophytes*. *J. Environ. Qual.* 12: 137 - 141.
- Reddy, K.R.; Campell, K.L.; Graetz, D.A. y Portier, K.M. (1982) *Use of biological filters for treating agricultural drainage effluents*. *J. Environ. Qual.* 11: 591 - 595.
- Ryter, S.W. y Tyrrell, R.M. (1998) *Singlet molecular oxygen ( $^1O_2$ ): a possible effector of eukaryotic gene expression*. *Free Radic. Biol. Med.*, 24: 1520 - 1534.
- Satyakala, G. y Kaiser, J. (1997) *Chromium induced biochemical changes in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. and *Pistia stratiotes* L.* *B. Environ. Contam. Toxicol.* 10: 159 - 169.
- Sayantan, D. (2013) *Amendment in phosphorus levels moderate the chromium toxicity in *Raphanus sativus* L. as assayed by antioxidant enzymes activities*. *Ecotox. Environ. Saf.* 95: 161 - 170.
- Scandalios, J.G. (1993) *Oxygen stress and superoxide dismutase*. *Plant Physiol.* 101: 7 - 12.
- Schulz, H. (1887) *Zur Lehre von der Arzneiwirdung*. *Virch. Archiv. Pathol. Anat. Phys. Klin. Med.* 108: 423 - 445.
- Sen, A.K. y Bhattacharyya, M. (1994) *Studies of uptake and toxic effects of Ni (II) on *Salvinia natans**. *Wat. Air Soil Pollut.* 78: 141 - 152.
- Seregin, I.V. y Kozhevnikova, A.D. (2006) *Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants*. *Russian J. Plant Physiol.* 2: 257 - 277.
- Shanker, K.A.; Djanaguiraman, M.; Sudhagar, R.; Chandrashekar, C.N. y Pathmanabhan, G. (2004) *Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vignaradiata* (L.) R. Wilczek. cv CO 4) roots*. *Plant Sci.* 166: 1035 - 1043.
- Sharma, P.; Jha, A.B.; Dubey, R.S. y Pessarakli, M. (2012) *Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions*. *J. Bot.* 12: 1 - 26.
- Shewry, P.R. y Peterson, J.P. (1974) *The uptake and transport of chromium by barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.)*. *J. Exp. Bot.* 25: 785 - 797.
- Shier, WT. (1994) *Metals as toxins in plants*. *J. Toxicology-Toxin Review.* 13: 205 - 216.
- Singh, K. y Pandey, S.N. (2011) *Effect of nickel-stresses on uptake, pigments and antioxidative responses of water lettuce, *Pistia stratiotes* L.* *J. Environ. Biol.* 32: 391 - 394.
- Sinha, S. y Gupta, A.K. (2005) *Translocation of metals from fly ash amended soil in the plant of *Sesbenia cannabina* L. Ritz: Effect on antioxidants*. *Chemosphere*, 61: 1204 - 1214.

- Sinha, S. y Pandey, K. (2003) *Nickel induced toxic effects and bioaccumulation in the submerged plant, Hydrilla verticillata (L.F.) role under repeated metal exposure*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71: 1175 - 1183.
- Skeffington, R.A., Shewry, P.R. y Peterson, P.J. (1976) *Chromium uptake and transport in barley seedlings (Hordeum vulgare L.)*. Planta 132: 209 - 214.
- Smirnoff, N. (1998) *Plant resistance to environmental stress*. Curr. Opin. Biotechnol. 9: 214 - 219.
- Soltan, M.E. y Rashed, M.N. (2003) *Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations*. Adv. Environ. Res. 7: 321 - 334.
- Southam, C.M. y Erlich, J. (1943) *Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture*. Phytopathology 33: 517 - 524.
- Srivastava, S.; Prakash, S. y Srivastava, M.M. (1999) *Chromium mobilization and plant availability –the impact of organic complexing ligands*. Plant Soil. 212: 203 - 208.
- Stohs, S.J. y Bagchi, D. (1995) *Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions*. Free Radical Biol. Med. 18: 321 - 336.
- Sundaramoorthy, P.; Chidambaram, A.; Ganesh, K.S.; Unnikannan, P. y Baskaran, L. (2010) *Chromium stress in paddy: (i) nutrient status of paddy under chromium stress; (ii) phytoremediation of chromium by aquatic and terrestrial weeds*. C. R. Biol. 333: 597 - 607.
- Symeonidis, L y Karataglis, S. (1992) *Interactive effects of Cd, Pb and Zn on root growth of two metal tolerant genotypes of Holcus lanatus L.* Biometals 5: 173.
- Szalontai, B.; Horváth, L.I.; Debreczeny, M.; Droppa, M. y Horváth, G. (1999) *Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy*. Photosynth. Res. 61: 241 - 252.
- Taylor, G.J. (1989) *Multiple metal stress in Triticum aestivum L., differentiation between additive, antagonistic, and synergistic effects*. Can. J. Bot. 67: 2272 - 2276.
- 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.; Maitiski, F.; Thompson, K. y Chadwick, T. (1989) *Evolution and performance of city of San Diego pilot-scale aquatic wastewater treatment system using water hyacinths*. Res. J. Water Pollut. Control Fed. 61: 1625 - 1635.
- Tewari, R.K.; Kumar, P. y Sharma, P.N. (2008) *Morphology and physiology of zinc-stressed mulberry plants*. J. Plant Nutr. Soil Sci. 171: 286 - 294.

- Tkalec, M.; Štefanić, P.P.; Cvjetko, P.; Šikić, S.; Pavlica, M. y Balen, B. (2014) *The effects of cadmium–zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants*. PLoS One 9: e87582
- Tripathi, B.N. y Gaur, J.P. (2004) *Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in Scenedesmus sp.* Planta 219: 397 - 404.
- Tripathi, B.N.; Mehta Anshu Amar, S.K. y Gaur, J.P. (2006) *Oxidative stress in Scenedesmus sp. during short- and long-term exposure to Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>*. Chemosphere 62: 538 - 544.
- Turner, R.G. y Marshall, C. (1972) *The accumulation of zinc by subcellular fractions of roots of Agrostis tenuis Sibth. in relation to zinc tolerance*. New Phytologist 71: 671 - 676.
- Turnquist, T.D., Urig, B.M. y Hardy, J.K. (1990) *Nickel uptake by the water hyacinth*. J. Environ. Sci. Heal. 25: 897 - 912.
- Vajpayee, P.; Sharma, S.C.; Rai, U.N.; Tripathi, R.D. 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.
- Van Assche, F. y Clijsters, H. (1986) *Inhibition of photosynthesis in Phaseolus vulgaris by treatment with toxic concentration of Zn: effects on electron transport and photophosphorylation*. Physiol. Plant. 66: 717 - 721.
- Van Assche, F. y Clijsters, H. (1990) *Effects of metals on enzyme activity in plants*. Plant Cell Environ. 13: 195 - 206.
- Van Breusegem, F.; Vranová, E.; Dat, J.F. y Inzé, D. (2001) *The role of active oxygen species in plant signal transduction*. Plant Sci. 161: 405 - 414.
- Vesk, P. y Allaway, W. (1997) *Spatial variation of copper and lead concentrations of Eichhornia crassipes plants in a wetland receiving urban run-off*. Aquat. Bot. 59: 33 - 44.
- Vesk, P.A.; Nockolds, C.E. y Allaway, W.G. (1999) *Metal localization in water hyacinth roots from an urban wetland*. Plant Cell Environ. 22: 149 - 158.
- Visviki, I. y J.W. Rachlin. (1991) *The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine alga Dunaliella minuta, in both acute and chronic exposure*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 271 - 275.
- Vogel-Mikuš, K.; Drobne, D. y Regvar, M. (2005) *Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonization of pennycress Thlaspi praecox Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia*. Environ. Poll. 133: 233 - 242.
- Vora, A.B. y Rao, V. (1988) *Water hyacinth as a scavenger of heavy metals from polluted waters of the river Sabarmati Ahmedabad*. Adv. Plant Sci. 1: 1 - 6.

- Vymazal, J. (2011) *Constructed wetlands for wastewater treatment: Five decades of experience*. Environ. Sci. Technol. 45, 61-69.
- Woolhouse, H.W. y Wainwright, S.J. (1977) *Some physiological aspects of copper and zinc tolerance in Agrostis tenuis Sibth: cell elongation and membrane damage*. J. Exp. Bot. 28: 1029.
- Wang, C.; Zhang, S.H.; Li, W.; Wang, P. y Li, L. (2011) *Nitric oxide supplementation alleviates ammonium toxicity in the submerged macrophyte Hydrilla verticillata (L.f.) Royle*. Ecotoxicol Environ. Saf. 74: 67 - 73.
- Wang, C.; Zhang, S.H.; Wang, P.F.; Qian, J.; Hou, J.; Zhang, W.J. y Lu, J. (2009) *Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant Hydrilla verticillata (L.f.) Royle*. Chemosphere 76: 938 - 945.
- Wang, H.T.; Feng, X.; Peng, M. y Tang, X. (2009) *Up-regulation of chloroplastic antioxidant capacity is involved in alleviation of nickel toxicity of Zea mays L. by exogenous salicylic acid*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 72: 1354 - 1362.
- Watt, R.K. y Ludden, P.W. (1999) *Nickel-binding proteins*. Cell Mol. Life Sci. 56: 604 - 625.
- Wellburn, A.R. (1994) *The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution*. J. Plant Physiol. 14: 307 - 313.
- Willekens, H.; Inze, D.; Van Montagu, M. y Van Camp, W. (1995) *Catalases in plants*. Mol. Breed 1: 207 - 228.
- Wolverton, B.C. (1975) *Water hyacinth for removal of cadmium and nickel from polluted waters*. NASA Tech. Memorandum X-72721, Natnl. Space Tech. Lab., Bay St. Louis, Ms.
- Wolverton, B.C. y McDonald, R.C. (1975) *Water Hyacinths and Alligator Weeds for removal of lead and mercury from polluted waters*. NASA Tech. Memorandum X-72723, Natnl. Space Tech. Lab., Bay St. Louis, Ms.
- Wu, F.B. y Zhang, F.P. (2002) *Alleviation of cadmium-toxicity by application of zinc and ascorbic acid in barley*. J. Plant Nutr. 25: 2745 - 2761.
- Xia, H. y Ma, X. (2006) *Phytoremediation of ethion by water hyacinth (Eichhornia crassipes) from water*. Biores. Technol. 97: 1050 - 1054.
- Yamasaki, S.; Fujii, N.; Matsuura, S.; Mizusawa, H.; Takahashi, H. (2001) *The M locus and ethylene-controlled sex determination in andromonoecious cucumber plants*. Plant Cell Physiol. 42: 608 - 619.
- Yapoga, S.; Ossey, Y.O. y Kouamé, V. (2013) *Phytoremediation of zinc, cadmium, copper and chrome from industrial wastewater by Eichhornia crassipes*. Int. J. Conserv. Sci. 4: 81 -86.



- Yuan, Q.H.; Shi, G.X.; Zhao, J.; Zhang, H. y Xu, Q.S. (2009) *Physiological and proteomic analyses of Alternanthera philoxeroides under zinc Stress*. Russ J Plant Physiol. 56: 495 - 502.
- Zhang, Q.; Wang, Y.P; Matear, R.J.; Pitman, A.J. y Dai, Y.J. (2014) *Nitrogen and phosphorous limitations significantly reduce future allowable CO<sub>2</sub> emissions*. Geophysical Res. Letters 41: 632 - 637.
- Zhang, X.B.; Liu, P.; Li, D.T.; Xu, G.D. y Hang, M.J. (2008) *FTIR spectroscopic characterization of chromium-induced changes in root cell wall of plants*. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi 28:1067 - 1070.
- Zhao, J.; Shi, G. y Yuan, Q. (2008) *Polyamines content and physiological and biochemical responses to ladder concentration of nickel stress in Hydrocharis dubia (Bl.) Backer leaves*. Biometals 21: 665 - 674.
- Zhao, Z.; Zhu, Y. y Cai, Y. (2005) *Effects of zinc on cadmium uptake by spring wheat (Triticum aestivum, L.) hydroponic study and short-time <sup>109</sup>Cd tracing study*. J. Zhejiang Univ. Sci. 6: 643 - 648.
- Zhou, K.Y.; Chen, S.S. y Li, M.Q. (1993) *Effect of different levels of phosphorus nutrition on the photosynthesis and respiration tobacco leaf*. Acta Phytophysiol. Sin. 19: 3 - 8.
- Zhu, Y.L.; Zayed, A.M.; Qian, J.H.; De Soltan, M.E. y Rashed, M.N. (2003) *Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations*. Advan. Environ. Res. 7: 321 - 334.

## 16.2 Presentaciones en Reuniones Científicas

- Galil, N. y Rebhum, M., (1990) *A comparative study of RBC and activated sludge in biotreatment of wastewater from an integrated oil refinery*. Proceedings of the Forty-Fourth Purdue Industrial Waste Conference.
- Soltan, M.E. (1999) *Behavior of water hyacinth in river Nile water (Egypt)*. Proceedings of the V<sup>th</sup> Conference on Engineering in the Chemical Industry. Hungarian Chemical Society, Budapest, p. 228-235.

## 16.3 Libros y capítulos de libros

- Adriano, D.C. (1986) *Trace Elements in Terrestrial Environment* (Eds.: Adriano, D.C.) Springer Verlag, New York.

- APHA (1998) *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Amer. Publ. Health Assoc., American Water Works Association, Water Environment Federation. N.Y.
- Bergmeyer, H.U. (1983) *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. I. VCH, Weinheim, Germany.
- 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.
- García, M.M.M (2009) *Mecanismos de resistencia a metales pesados en Erica andevalensis*. Tesis, ISBN: 978-84-92679-62-1.
- Greger, M. (2004) *Metal availability, uptake, transport and accumulation*. En: *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*. (Eds.: Prasad, M.N.V.). Springer- Verlag, p 1 - 27.
- Haguenoer, J.M. y Furon, D. (1981) *Toxicology et hygiene industrielles*. Tome 1. Les dérivés minéraux. Technique and Documentation. Paris, p 148.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3<sup>rd</sup> Ed, Oxford University Press, Oxford.
- Hewitt, E.J. (1983) *A perspective of mineral nutrition: essential and functional metals in plants*. En: *Metals and Micronutrients: Uptake and Utilization by plants* (Eds.: Robb, D.A. y Pierpoint, W.S.) Academic Press, London, p. 277 - 323.
- Kabata-Pendias, A. y Pendias, H. (2000) *Trace elements in soil and plants*. Third ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kadlec, R.H. y Wallace, S.D. (2009) *Treatment Wetlands*. 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kalff, J. (2002) *Limnology*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Macnair, M.R. (1997) *The evolution of plants in metal-contaminated environments*. En: *Environmental Stress, Adaptation and Evolution*. (Eds.: Bijlsma, R. y Loeschcke, V.) Birkhauser, Switzerland, p.1-24.
- Mahler, R.L. (2003) *General overview of nutrition for field and container crops*. En: *Tech Coords. National Proceeding: Forest and Conservation Nursery Associations*. (Eds.: Riley, L.E.; Dumroese, R.K.; Landis, T.D.) Springfield, IL. Proc. RMRS-P-33.
- Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press Inc., London, p 889.
- McGrath, S.P. y Smith, S. (1990) *Chromium and nickel*. En: *Heavy Metals in Soils*. (Eds.: Alloway, B.J.) John Wiley, New York, p. 125– 150.
- Mitchell, D.S. (1976) *The growth and management of Eichhornia crassipes and Salvinia spp. in their native environment and in alien situations*. En: *Aquatic weeds in Southeast Asia* (Eds.: Varshney, C.K., Rzoska, J.) Publishers. p. 396.

- Mysliwa-Kurdziel, B.; Prasad, M.N.V. y Strzalka, K. (2004) *Photosynthesis in heavy metal stressed plants*. En: Prasad, M.N.V. (Eds.: *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*) University of Hyderabad, Hyderabad, p. 146 - 181.
- Nilsen, E.T. y Orcutt, D.M. (1996) *The physiology of plants under stress: abiotic factors*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Prasad, M.N.V. (2004) *Heavy metal stress in plants. From biomolecules to ecosystems*. 2<sup>nd</sup> ed. Narosa Publishing House, 22 Daryaganj, New Delhi.
- Repetto, M.; Semprine, J. y Boveris, A. (2012) *Lipid Peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination*. En: Catala, A. (Eds.) *Lipid Peroxidation*. InTech., Rijeka, p. 3-30.
- Ross, S.M. y Kaye, K.J. (1994) *The meaning of metal toxicity in soil plant systems*. En: Toxic metals in soil-plant systems (Eds: Ross, S.M.). John Wiley & Sons, Chichester, p. 27-61
- Shaw, B.P.; Sahu, S.K. y Mishra, R.K. (2004) *Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants*. En: Prasad, M.N.V. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*. Springer-Verlag Heidelberg, Berlin. p 84-126.
- Taylor, M.C. y Demayo, A. (1989) *Zinc*. En: Guidelines for Surface water quality. Vol. 1 Inorganic chemical substances. Environment Canada, Inland Water Directorate, Water Quality Branch, Ottawa.
- USEPA (1994) *Method 200.2: Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements*. Rev. 2.8. United States Environmental Protection Agency, Washington D.C., USA.
- USEPA (1998) *North American treatment wetland database*. Version 2.0. Environmental Technology Initiative, United States Environmental Protection Agency.
- Vega, G.S. y Reynaga, O.J. (1990) *Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Noriega, Limusa. México.