

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad
Nacional del Litoral para la obtención del Grado Académico de:

Doctor

En el Campo de:
Química

Título de la Tesis:

“Sorci3n de Cr y Cd por Macr3fitas”

Instituci3n donde se realiz3:

Química Analítica
Facultad de Ingeniería Química (UNL)

Autor:

Lic.Noemí Lilliana Suñe

Directora: Dra. Ma. Alejandra Maine
Codirector: Dr. Carlos A. Bonetto

AGRADECIMIENTOS:

Deseo expresar mi agradecimiento a todos los que de una manera u otra han contribuido a la realización de este trabajo.

A mi Directora, Dra María Alejandra Maine por la constante colaboración, orientación y confianza recibida a lo largo de todos estos años, pero principalmente por su amistad. A mi Codirector, Dr. Carlos A. Bonetto.

A mis compañeros de trabajo y amigos, Gabriela Sánchez, Sandra Caffaratti y María del Carmen Pedro, por compartir el trabajo diario y por la constante ayuda recibida para la realización de esta tesis. A Jorge Hammerly, Juan Carlos Bazán, Hernán Hadad, Susana Lagger y Cecilia Panigatti por la colaboración brindada.

A la Universidad Nacional del Litoral, que a través del apoyo financiero de la Programación CAI + D ha permitido la concreción de muchas de las experiencias.

A Bahco Argentina S. A. y a los Ings. José Realini y Mariano Meinardy por permitirme y permitirnos llevar a cabo la realización y el estudio de un wetland experimental.

A mis padres por su aliento y ayuda incondicional para alcanzar esta meta.

A Jorge, Facundo y Rodrigo por el tiempo que les quité y la paciencia que demostraron.

ÍNDICE GENERAL

	<u>Página</u>
Resumen	6
1. Introducción	8
1.1. Los metales en sistemas biológicos	9
1.2. Propiedades bioquímicas generales de los cationes metálicos	12
1.2.1. Mecanismos de captación y transformación de los elementos traza por los seres vivos.	13
1.2.1.1. Captación de cationes	13
1.2.1.2. Captación de aniones	14
1.2.1.3. Mecanismos de toxicidad	14
1.2.1.4. Mecanismos de defensa y detoxificación	15
1.3. Características bioquímicas del cadmio	17
1.3.1. Acción tóxica general	18
1.4. Características bioquímicas del cromo	19
1.4.1. Acción tóxica general	20
1.4.2. Cromo como elemento esencial	24
1.5. Remediación de ambientes contaminados con metales	25
1.6. Objetivos	30
2. Materiales y métodos	32
2.1. Muestras	32
2.2. Metodología analítica empleada	33
2.2.1. Determinaciones analíticas en agua	33
2.2.2. Determinaciones analíticas en vegetales	34
2.3. Análisis estadístico	35
3. Eficiencia de remoción de cromo y cadmio de diferentes macrófitas flotantes regionales.	36
3.1. Descripción de la experiencia	36
3.1.1. Elección de las macrófitas	36
3.1.2. Metodología	36
3.1.2.1. Experiencia 3.1.	37
3.1.2.2. Experiencia 3.2.	37
3.2. Resultados y discusión	37
3.3. Conclusiones	42
4. Efecto de la cantidad de biomasa vegetal en la remoción del metal de la solución	44
4.1. Descripción de la experiencia	44
4.2. Resultados y discusión	45
4.2.1. Experiencia 4.1.	45
4.2.2. Experiencia 4.2.	48
4.2.3. Experiencia 4.3.	51
4.2.4. Experiencia 4.4.	53
4.3. Diferencias entre las dos macrófitas utilizadas	56
4.4. Conclusiones	58
5. Determinación de la capacidad de bioacumulación de <i>P. stratiotes</i> y	59

<i>S. herzogii</i> a diferentes concentraciones de Cr y Cd.	
5.1. Descripción de la experiencia	59
5.1.1. Experiencia 5.1.	59
5.1.2. Experiencia 5.2.	59
5.1.3. Diseño de las experiencias	60
5.2. Resultados y discusión	60
5.2.1. Experiencia 5.1.	60
5.2.2. Experiencia 5.2.	63
5.3. Conclusiones	66
6. Capacidad de bioacumulación de Cr(VI) de <i>P. stratiotes</i> y <i>S. herzogii</i>	68
6.1. Descripción de la experiencia	68
6.2. Resultados y discusión	68
6.3. Comparación entre la bioacumulación de Cr(III) y Cr(VI)	73
6.4. Conclusiones	77
7. Distribución de Cr y Cd en <i>P. stratiotes</i> y <i>S. herzogii</i> .	79
7.1. Descripción de la experiencia	79
7.1.3. Diseño de las experiencias	79
7.2. Resultados y discusión	79
7.3. Conclusiones	83
8. Translocación de Cr y Cd en la planta.	84
8.1. Descripción de la experiencia	84
8.2. Resultados y discusión	86
8.3. Conclusiones	94
9. Sorción de cromo y cadmio por raíces secas de <i>P. stratiotes</i> y <i>S. herzogii</i> .	95
9.1. Descripción de la experiencia	95
9.2. Resultados y discusión	95
9.3. Conclusiones	99
10. Desorción de Cd y Cr en <i>P. stratiotes</i> y <i>S. herzogii</i>	100
10.1. Descripción de la experiencia	100
10.2. Resultados y discusión	101
10.3. Conclusiones	107
11. Efecto de los microorganismos en la remoción de Cr (VI)	109
11.1. Descripción de la experiencia	109
11.2. Resultados y discusión	111
11.3. Conclusiones	113
12. Análisis químico por rayos X	114
12.1. Descripción de la experiencia	114
12.2. Resultados y discusión	115
12.3. Conclusiones	120
13. Modelo cinético para la sorción de Cd, Cr(III) Y Cr(VI) por <i>P. stratiotes</i> y <i>S. herzogii</i>	122
13.1. Descripción de la experiencia	122
13.2. Resultados y discusión	123
13.3. Conclusiones	132
14. Caso de aplicación: Wetland experimental para tratamiento de un efluente real de industria metalúrgica.	134

14.1 Descripción del trabajo	135
14.1.1. Diseño del humedal	135
14.1.2. Descripción del estudio	138
14.1.3. Análisis estadístico	139
14.2. Resultados	140
14.2.1. Agua	140
14.2.2. Sedimentos	143
14.2.3. Vegetación	144
14.2.3.1. Cobertura vegetal	144
14.2.3.2. Concentraciones de metales en la vegetación	145
14.3. Discusión	147
14.4. Conclusiones	154
15. Conclusiones generales	156
Anexo I. Características fisicoquímicas del agua de laguna utilizada en las experiencias realizadas.	160
Anexo II. Características generales de Cd y Cr.	161
Anexo III. Espectros del análisis por rayos X	164
Anexo IV. Micrografías de hojas y raíces de <i>S. herzogii</i> y <i>P. stratiotes</i> contaminadas con Cr y Cd.	184
Anexo V. Monitoreo y control de las muestras multivariadas	194
Bibliografía	214

-

RESUMEN

Se determinó la eficiencia de remoción de Cr y Cd de diferentes macrófitas flotantes regionales. Debido a su mayor eficiencia y tolerancia se seleccionaron *Salvinia herzogii* y *Pistia stratiotes*. A fin de determinar los mecanismos mediante los cuales los metales ingresan a las plantas y plantear un modelo cinético para la sorción de Cd y Cr se plantearon distintas experiencias. Los objetivos fueron determinar la capacidad de bioacumulación a diferentes concentraciones de Cr(III), Cr(VI), y Cd, la distribución de estos metales en las distintas partes de la planta, el proceso de translocación, si la presencia o ausencia de microorganismos afecta la remoción de Cr, la eficiencia de sorción de Cr y Cd por masa no viva de macrófitas.

S. herzogii y *P. stratiotes* pueden reducir la concentración de Cr y Cd en agua a muy bajos niveles, trabajando con concentraciones de hasta 6 mg l^{-1} de estos metales, presentando la primera de las especies una mejor tolerancia, reflejada en su tasa de crecimiento. Ambas especies acumulan tanto Cr (III) como Cd principalmente en raíces y esta acumulación se produce fundamentalmente en las primeras horas. Cuando el Cr se suministró en forma de Cr(VI) las plantas mostraron síntomas de toxicidad, siendo *P. stratiotes* la menos tolerante. Las eficiencias de remoción obtenidas fueron significativamente menores a las obtenidas para Cr (III).

Los porcentajes de remoción de Cr(III) o Cd en agua a las diferentes concentraciones estudiadas fueron similares y en ningún caso se alcanzó el 100 % de remoción. Por lo que se propuso que tanto la remoción de Cd como la de Cr (III) involucran dos procesos: uno rápido y uno lento. El rápido, virtualmente instantáneo, se produce durante los primeros minutos de contacto. La rapidez de la sorción podría sugerir que la sorción física o adsorción (fijación a las cargas negativas de la pared celular) es un

importante mecanismo de remoción. Esta etapa rápida podría también incluir procesos de sorción química (absorción) como quelación. La precipitación inducida por las raíces y procesos biológicos como la toma intracelular (transporte a través del plasmalema a las células interiores) son probablemente los responsables del componente más lento de la remoción del metal de la solución. Los mecanismos de sorción fueron diferentes para los dos metales y las dos especies estudiadas.

Las raíces de plantas no vivas de *P. stratiotes* y *S. herzogii* pueden ser usados como biosorbentes de Cr(III) y Cd, comportándose como material de intercambio catiónico débil. El principal mecanismo involucrado en la sorción fue el intercambio entre iones monovalentes presentes en la biomasa y los iones metálicos pesados (Cr y/o Cd) y los protones tomados de la solución.

A fin de experimentar a campo los conocimientos adquiridos en el laboratorio, las macrófitas estudiadas se utilizaron en un wetland construido a escala experimental, y demostraron ser eficientes en la sorción de Cr, Ni y Zn de un efluente de una industria metalúrgica. Sin embargo no mostraron adecuada tolerancia a las características fisicoquímicas del efluente y produjeron depleción de oxígeno.

1. INTRODUCCION

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

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

El cadmio es un metal tóxico, que puede ocasionar graves problemas a la salud del hombre. Proviene de los efluentes de las industrias de fertilizantes, refinerías de petróleo, platinado y acabado de metales, acero y trabajos con metal no ferroso. De acuerdo al

Código Alimentario Argentino y la Ley Provincial 11.220 el nivel máximo permitido en agua de bebida es $0,005 \text{ mg l}^{-1}$.

El Cr es introducido en los ecosistemas naturales como el resultado de diferentes actividades industriales, como la industria del hierro y acero, el curtido de cuero, industrias de cromado y otras fuentes de contaminación antropogénica. De acuerdo al Código Alimentario Argentino y la Ley Provincial 11.220 el nivel máximo permitido en agua de bebida es $0,05 \text{ mg l}^{-1}$.

Ambos integran la lista de la U.S. Environmental Protection Agency como uno de los 129 contaminantes prioritarios.

1.1. LOS METALES EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

Los seres vivos habitamos en un entorno esencialmente inorgánico y a través de distintas etapas de la evolución debimos adaptarnos a ese entorno y aprendimos a utilizarlo para nuestro mejor desarrollo. En la actualidad, veintisiete elementos se reconocen como esenciales. De estos elementos, aparte del carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, que son constituyentes básicos y característicos de los compuestos orgánicos, todos los demás son elementos típicamente inorgánicos. Estos elementos pueden ser divididos en tres grandes grupos, de acuerdo a su abundancia en los sistemas biológicos. En el primer grupo, se ubican los mayoritarios los que representan más del 98 % del peso de un humano adulto, éstos son: C, H, N, O y además Na, K, Mg, Ca, Cl, S y P. En el segundo grupo, se incluyen los elementos trazas como Fe, Zn, Si, F y Br. En el tercer grupo, se ubican los elementos micro-traza, o ultra-micro-traza. En este grupo se ubican elementos cuyas concentraciones son sumamente bajas pero de esencialidad reconocida (Mo, I, Co) y otros cuyas concentraciones y/o funciones todavía no están claramente

establecidas (Cr, Ni, As, V). La Tabla 1 muestra la abundancia de estos elementos en un adulto humano normal de 70 Kg de peso. Como se puede observar el cromo se debería encontrar en nuestro organismo en cantidades ultramicrotrazas y el cadmio no esta presente naturalmente.

Tabla 1. Composición elemental promedio de un humano adulto normal de 70 kg de peso. (W. Kaim y B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, B.G.Teubner, Stuttgart, 1994.)

Elemento		g/70 kg de peso
Componentes mayoritarios	O	45.500
	C	12.600
	H	7.000
	N	2.100
	Ca	1.050
	P	700
	S	175
	K	140
	Na	105
	Cl	105
Elementos traza	Mg	35
	Fe	4,2
	Zn	2,3
	Si	1,4
	Cu	0,1
	F	0,8
Elementos ultramicro traza	Br	0,2
	I	0,03
	Mn, V, Si	0,02
	As, B, Ni	0,01
	Cr, Mo	0,005
	Co	0,003

Los elementos que ingresan al medio ambiente pueden ser clasificados en tóxicos y no-tóxicos. De cualquier forma un elemento esencial puede transformarse en tóxico, cuando se sobrepasan ciertos límites de concentración. En la Figura 1 se ilustra la relación entre la dosis o concentración del elemento esencial y su efecto o respuesta fisiológica.

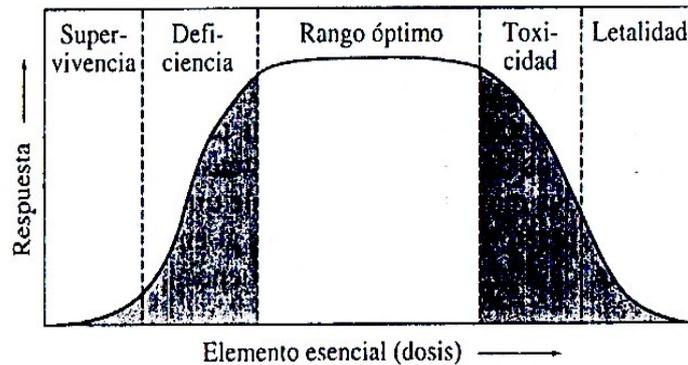


Figura 1: Efecto de la dosis de un elemento esencial sobre la respuesta fisiológica (Diagrama de Bertrand).

En el caso de una especie tóxica, el efecto fisiológico es siempre negativo cualquiera sea la dosis del elemento. La Figura 2 muestra la comparación de un elemento esencial y uno tóxico

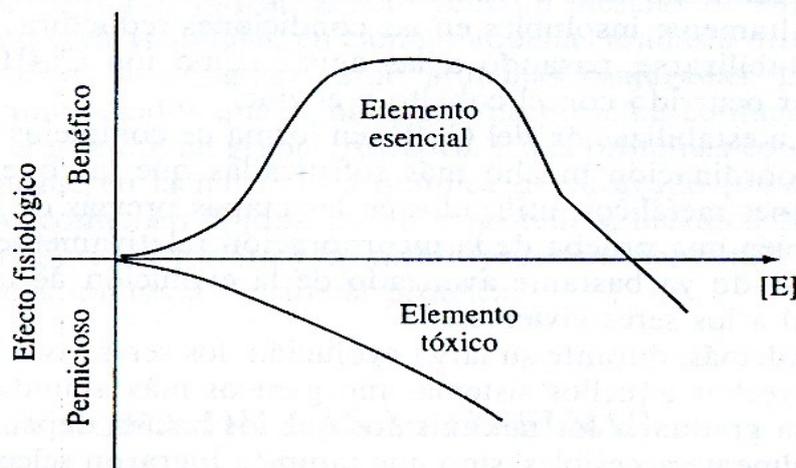


Figura 2: Comparación del efecto de la dosis de un elemento esencial y de un elemento tóxico sobre la respuesta fisiológica.

Es interesante resaltar que varios de los elementos reconocidos como tóxicos para casi la mayoría de los organismos están ubicados, en la tabla periódica de los elementos, muy cerca de los esenciales. El posible modo de acción de estos elementos tóxicos se origina en algún tipo de competencia con los elementos esenciales que son químicamente similares a ellos, por ejemplo:

Elemento esencial	Elemento competitivo
Zn	Cd, Hg
Ca	Pb, Cd
K	Tl
Mg	Be, Al
P	As
S	Se

1.2. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS GENERALES DE LOS CATIONES METÁLICOS

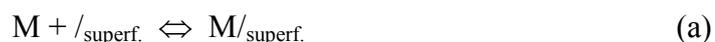
En principio los cationes di-valentes y tri-valentes utilizados en los sistemas biológicos pueden manejarse como ácidos σ , es decir que potencialmente pueden actuar como aceptores electrónicos por vía σ . Una forma de clasificarlos es utilizando el concepto de ácidos y bases duros y blandos. En este sentido las especies biológicas H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+3} , Cr^{+3} y Fe^{+3} , son ácidos duros, mientras que Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} , Mn^{+2} y Co^{+2} son ácidos intermedios. Por lo tanto, y de acuerdo a la regla de

Pearson, estos ácidos tenderán preferentemente a coordinarse con bases duras como átomos de oxígeno (agua, carboxilatos, restos de fosfatos o funciones alcohol) y nitrógeno (grupos imidazol, uniones peptídicas, bases nucleicas). Esto significa que los organismos son desde este punto de vista, sistemas duros. Por el contrario, muchos elementos tóxicos y contaminantes inorgánicos típicos, tales como Tl^+ , Cd^{+2} , Hg^{+2} o Pb^{+2} , son ácidos blandos y muestran preferencia por ligandos blandos (grupos tiolato, sulfuro, seleniuro) (Ahrlund, et al., 1958, Pearson, 1963, Fraústo Da Silva y Williams, 1993, Barán E.J. 1995).

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

1.2.1.1. Captación de cationes

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



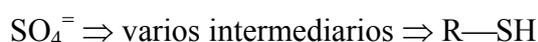
Pueden ocurrir procesos redox antes de la transferencia del catión al interior de la célula o después de ella. Y, finalmente, el quelato ML' puede constituir la vía de transporte del elemento a otro sitio celular, donde se genera un nuevo complejo $ML''(e)$.

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

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

1.2.1.2. Captación de aniones

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



1.2.1.3. Mecanismos de toxicidad

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

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

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

1.2.1.4. Mecanismos de defensa y detoxificación

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

Tolerancia: acepta y tolera la presencia del elemento tóxico.

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

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

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

Se reconocen mecanismos típicos y de características bastante definidas como:

- La retención o absorción de metales tóxicos por las membranas celulares. Estos mecanismos son poco específicos y en ellos pueden participar, por ejemplo, las glicoproteínas y mucopolisacáridos que forman parte de esas membranas. Incluso alguna de estas biomoléculas pueden ser segregadas desde el interior de la célula, ante un aumento de la concentración de la especie tóxica en el entorno.
- La inmovilización de metales tóxicos en forma de gránulos o corpúsculos insolubles, corpúsculos de inclusión, que quedan fijados en ciertos tejidos y aíslan a la especie tóxica. Están constituidos por formaciones de capas concéntricas que contienen cantidades variables de calcio, magnesio, carbonato y fosfato junto a pequeñas proporciones de metales pesados (Pb, Cd, Ag, Sn, Sr, Ba) que de esta manera quedan inmovilizados. Es un tipo particular de biominerales, resultantes de mecanismos de detoxificación. Por similar mecanismo, algunos metales pesados, como Pb(II) y Cd(II) pueden quedar retenidos en el hueso.
- La transformación del elemento tóxico en una especie química no tóxica. Esto se denomina detoxificación química y un ejemplo interesante es la quelación de metales pesados por parte de las metalotioneínas (proteínas de bajo peso molecular con un contenido inusual de átomos de azufre provenientes de residuos de cisteína). Se encontró que la síntesis de metalotioneínas aumenta considerablemente cuando el organismo se expone a sales de Cd(II) o Hg(II), lo que muestra con claridad su intervención en procesos de detoxificación (Barán E.J. 1995).

Lo expuesto anteriormente nos brinda una idea general de los metales en los sistemas biológicos. A continuación se describen las características bioquímicas y la toxicidad de cadmio y cromo en los seres humanos.

1.3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL CADMIO

En su forma catiónica este elemento presenta fuertes analogías químicas con dos elementos esenciales, el Zn(II) y el Ca(II). Estas analogías dan cuenta de sus principales efectos tóxicos.

Sus efectos bioquímicos generales son muy variados, actuando como inhibidor de numerosos procesos celulares y afectando notablemente el metabolismo de algunos otros elementos esenciales, aparte del zinc y del calcio (Cu, Fe, Se). Cuando estos elementos están en defecto, la toxicidad del cadmio resulta potenciada, en cambio, cuando están en exceso, la toxicidad se ve disminuida.

El cadmio puede ingresar a los organismos por vía respiratoria o a través de los alimentos. El cadmio se acumula principalmente en el riñón, donde tiene un tiempo de residencia extremadamente largo, lo que genera una continuada acumulación del elemento a lo largo de la vida, en este órgano. Interesante de comentar es que los fumadores presentan tanto en el riñón, como en sangre, niveles de Cd (II) marcadamente más elevados que los no fumadores e, incluso, el humo del cigarrillo constituye una de las fuentes de absorción de cadmio más efectivas. (Groten et al. 1994).

Los mecanismos exactos de toxicidad, que seguramente son múltiples, todavía no se conocen con claridad. Los síntomas de intoxicación incluyen, fuertes dolores de cabeza, vómitos y calambres abdominales, acompañados muchas veces de cuadros de hipertensión. En los casos de intoxicación también se observa una creciente eliminación urinaria de glucosa, aminoácidos y proteínas de bajo peso molecular así como un aumento de la relación Ca/P.

Una enfermedad crónica bastante conocida y asociada a exposiciones prolongadas a excesos de cadmio es el mal conocido con el nombre de "itai-itai" y que ocurre en forma endémica en la cuenca del río Jintsu, en Japón. Este río tiene niveles de cadmio marcadamente elevados, de forma que esa sobrecarga afecta de alguna manera a toda la región, e incluso ha aumentado los niveles de ese elemento en el arroz que se cosecha en la misma. En esta enfermedad ocurre una paulatina incorporación de Cd (II) a los tejidos duros, la que finalmente genera una gran fragilidad y dolorosas deformaciones del material óseo. (Bernard y Lauwerys 1984).

1.3.1. Acción tóxica general

Se manifiesta principalmente sobre la función renal y los tejidos pulmonar y óseo, aunque también tiene acción directa sobre la corteza cerebral. Produce una inhibición enzimática de aquellas enzimas que utilizan como cofactor el Cinc (estructura similar con el Cinc). Compite con el calcio por los lugares de unión de proteínas reguladoras, como por ejemplo la calmodulina. Habrá alteración en el metabolismo del calcio y del fósforo con "osteopatía del cadmio". Es capaz de producir carcinogénesis, principalmente a nivel prostático, aunque también en riñón y pulmón.

El efecto protector de las metalotioneínas frente a la acumulación de niveles tóxicos de cadmio origina otra forma de interacción del cadmio con el metabolismo del cinc. Asimismo, se ha reconocido una cierta competencia entre la absorción de Cd(II) y Ca(II), demostrándose que bajos niveles de calcio, favorecen la absorción de cadmio. Las fitoquelatinas (metalotioneínas en las plantas) acomplejan cationes, especialmente Cd, volviéndolos menos perjudiciales para las células de las plantas (Weigel and Jager, 1980). Una fuerte correlación se encontró entre el contenido de fitoquelatinas y la tolerancia de Cd en células de tomate. Las fitoquelatinas son vitales en la detoxificación de Cd en *A. Thaliana* (Howden, et al. 1995). El último destino del complejo PC-Cd es la deposición en las vacuolas de las células de las raíces por transporte activo (Vogeli-Lange y Wagner, 1990).

También es interesante consignar que algunas levaduras han desarrollado estrategias diferentes para la detoxificación de cadmio, eliminándolo en forma de pequeñas partículas de CdS, estabilizadas por péptidos de bajo peso molecular.

1.4. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL CROMO

Los estados de oxidación más comunes del cromo en compuestos inorgánicos son +III y +VI, pero bajo la mayoría de las condiciones ambientales el Cr (VI) se reduce rápidamente a Cr (III). Solo Cr(III) y Cr(VI) parecen ser significantes en sistemas biológicos, mientras que compuestos de Cr tetra o pentavalente pueden ocurrir como intermediarios reactivos de corta vida en reacciones redox. El Cr(VI), considerada la forma más tóxica de Cr, se presenta como iones $\text{CrO}_4^{=}$ o $\text{Cr}_2\text{O}_7^{=}$. Contrariamente, el

Cr(III) en forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos, es mucho menos móvil y generalmente se encuentra acomplejado a la materia orgánica en suelos o ambiente acuáticos. El Cr(VI) es un agente oxidante fuerte y en presencia de materia orgánica es rápidamente reducido a Cr(III). De cualquier forma, altas concentraciones de Cr(VI) pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y entonces persistir como contaminantes. El Cr(III) solo puede ser oxidado a Cr(VI) en presencia de grandes cantidades de Mn(V), transformándose nuevamente en la forma más tóxica. (McGrath and Smith, 1990; Vajpayee, et al., 1999)

A pesar que los primeros descubrimientos en la química organometálica del cromo se hicieron en 1866 y desde entonces una gran variedad de compuestos organocromados con estados de oxidación desde $-IV$ a $+VI$ se han descrito, la forma química del cromo en sistemas biológicos está lejos de ser entendida.

El Cr, al contrario de otros metales, como por ejemplo el Cd, no es acumulado en el organismo, ni siquiera en el hígado, lugar preferente de otros metales. (Kagi y Hapke, 1984, Barceló et al, 1987)

1.4.1. Acción tóxica general

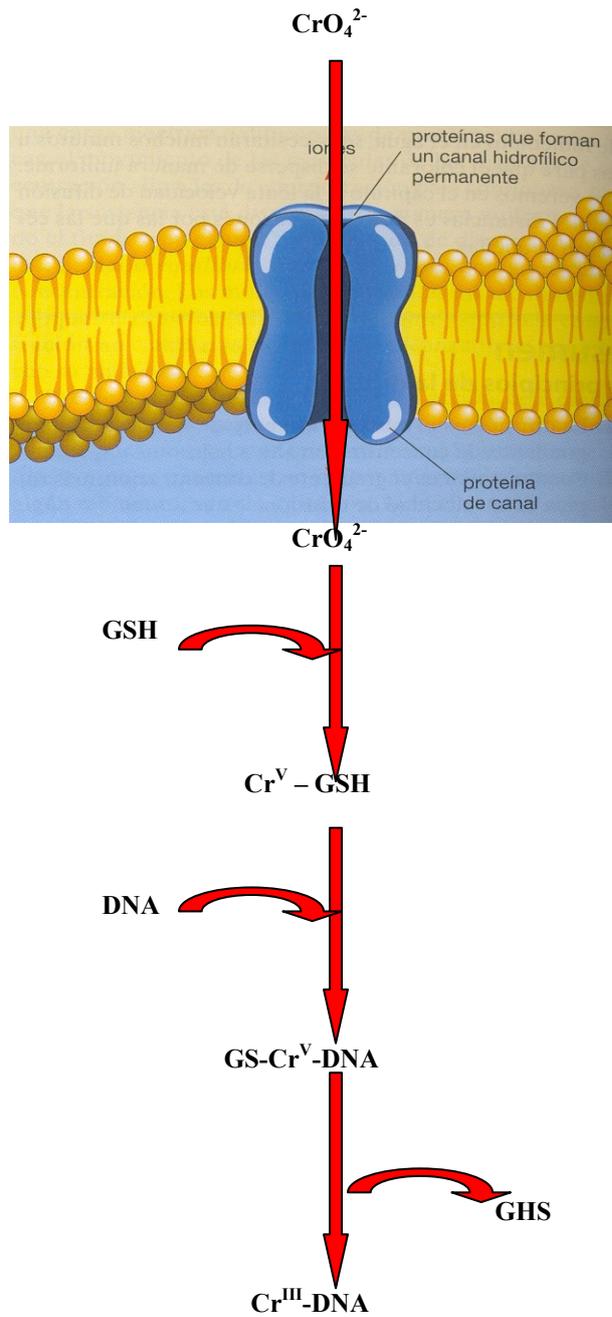
Los compuestos de Cr(VI) son altamente tóxicos para todos los organismos. Difunde fácilmente a través de las membranas celulares debido a su elevada solubilidad. El $CrO_4^{=}$, como muchos otros aniones como $SO_4^{=}$ y $VO_4^{=}$, entra a la célula por medio de un sistema específico conocido como transporte aniónico a través de la membrana exterior (intestino, pulmones, branquias, corteza cerebral, raíces, etc.).

El Cr(VI) una vez en el interior de la célula, por su fuerte poder oxidante puede causar:

- 1- Daños en el ADN.
- 2- Interferencias en el metabolismo del Ca, P y Zn.
- 3- Pérdida del control del crecimiento.
- 4- Actividades enzimáticas anormales.
- 5- Alteración en la química de la sangre.
- 6- Baja resistencia a patógenos orgánicos.
- 7- Modificaciones en el comportamiento.
- 8- Incorrecta conexión y desconexión del tejido alrededor de células afectadas. Este es el caso del cáncer, donde el daño es virtualmente irreparable, excepto a través de la muerte de la célula.

Se requiere para la reducción de Cr(VI) a Cr(III) la transferencia de tres electrones y existen unos pocos sistemas bioquímicos de reducción disponibles como eficientes reductores para Cr(VI): las hemo y flavoproteínas y tioles como glutatona y ascorbato (Kaim and Schwedersky, 1994). Entonces, a bajos niveles de exposición, los iones Cr(VI) que ingresan a la célula son reducidos en los fluidos del cuerpo (jugo gástrico, tracto respiratorio, sangre), antes de que lleguen a poder interactuar con el ADN, a menos que la dosis sea lo suficientemente elevada como para superar la capacidad de reducción de estos fluidos.

Esquema de acción tóxica del Cr(VI)



Mecanismo de toxicidad: Una vez en el citoplasma, el Cr(VI) reacciona con glutatión (GSH), un tripéptido presente en concentración 5mM aproximadamente, que contiene un grupo sulfhidrilo cisteínico. En esta reacción el CrO_4^- se reduce a Cr(V) y Cr(IV), y se

forma un enlace Cr-S. El ión metálico es entonces atrapado en la célula y no puede difundir al plasma.

La unión al ADN seguida por la última reducción a Cr(III) se piensan que son los pasos adicionales que constituyen la acción carcinogénica de este ión.

El Cr(III) tiene muy poca afinidad por los sulfuros y preferentemente forma complejos con átomos donores N u O como ligandos. El Cr(III) se enlaza fuertemente a grupos carboxílicos de aminoácidos en proteínas formando complejo binucleares.

En química inorgánica se conoce al Cr(III) por su cinética inerte. Si formase parte de metaloproteínas estas no reaccionarían rápidamente. Por la misma razón, no juegan un rol importante en la bioquímica. Pero de hecho, si están presentes en la célula, pueden ser tóxicos.

Un exceso en la biodisponibilidad de un elemento, puede causar problemas directa o indirectamente. Indirectamente, limita un segundo elemento esencial, provocando deficiencia secundaria (Barán E.J. 1995). Este sería el efecto del Cr(III) dentro de la célula, ya que puede reaccionar con moléculas orgánicas formando complejos muy estables, de esta manera compite con otros metales en la formación de enzimas, inhibiendo de esta forma los sistemas enzimáticos.

El Cr(III) hexacoordinado tiene un radio iónico efectivo de $62 \cdot 10^{-12}$ m el cual es muy semejante al del Fe(III) ($65 \cdot 10^{-12}$ m), por lo que la aparición de Cr(III) en sitios de Fe(III) es posible. El Cr ha sido satisfactoriamente sustituido en varias Fe-metaloproteínas tales como la proteína de transporte de Fe(III) transferrina (Hopkins and Schwarz, 1964) y el citocromo P450.

Complejos nucleótidos de Cr(III) cinéticamente inertes han sido preparados y estructuralmente caracterizados (Dunaway-Mariano and Cleland, 1980). Estos compuestos frecuentemente sirven como inhibidores de enzimas las cuales requieren sustratos nucleótidos de Mg(II).

1.4.2. Cromo como elemento esencial

El reconocimiento de la esencialidad del cromo para los organismos superiores es relativamente reciente, habiéndose acumulado creciente evidencia de su participación en el metabolismo de los lípidos y los hidratos de carbono, así como la activación de algunos sistemas enzimáticos, en el metabolismo tiroideo y en la estabilización de proteínas y ácidos nucleicos.

Pero su efecto particular más notable es su participación en la potenciación de la acción de la insulina, en forma de uno o más complejos de Cr(III), a los que se ha llamado genéricamente factor de tolerancia a la glucosa (FTG).

Estudios con animales de laboratorio, alimentados en estricta ausencia de cromo, muestran un deterioro creciente de su tolerancia a la glucosa intravenosa, situación que logra revertirse rápidamente por agregado de una variedad de compuestos de cromo a las dietas. Asimismo, en ausencia estricta de cromo, los animales desarrollan un síndrome consistente en deficiencias de crecimiento, rápida hiperglucemia y glucosuria, así como elevados niveles de colesterol. La levadura de cerveza se mostró como particularmente efectiva en la reversión de este síndrome y se pudo demostrar que el factor nutricional responsable de esta acción era el antes mencionado FTG.

El aislamiento y caracterización de este factor es muy difícil, fundamentalmente porque el mismo se va tornando inestable a medida que aumenta su

pureza lo que sugiere que *in vitro* seguramente debe estar estabilizado por alguna proteína. Se cree que el factor consiste en un complejo de Cr(III), aparentemente ligado a ácido nicotínico, glicina, cisteína y ácido glutámico o, tal vez, directamente al tripéptido glutatión, que está constituido por los tres aminoácidos recién mencionados. También se ha sugerido que el FTG puede ser en realidad una mezcla compleja de varios compuestos diferentes de cromo. Por otra parte, un complejo sintetizado a partir de acetato de cromo (III) y los cuatro ligandos mencionados mostró poseer una actividad similar a la del FTG. El ácido nicotínico parece desempeñar un papel fundamental en la estabilización y actividad del factor (Fraústo Da Silva y Williams, 1993; Barán, 1995).

Mucho se ha especulado acerca de los posibles mecanismos de acción del FTG. Entre las propuestas planteadas podemos citar las siguientes: a) El factor podría formar un complejo con la insulina en la sangre o el páncreas o potenciar la fijación inicial de la insulina a los tejidos; b) podría inhibir a la insulina; c) Podría actuar como cofactor de un sistema involucrado en el transporte de glucosa a través de las membranas; d) Podría catalizar la interacción inicial entre la insulina y un sitio receptor específico de las membranas.

1.5. REMEDIACIÓN DE AMBIENTES CONTAMINADOS CON METALES

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

iónico (Markus and Kertes, 1969), son costosas, relativamente ineficientes y en la mayoría de los casos generan una gran cantidad de desechos de difícil disposición. En los últimos años se han propuesto técnicas de bioremediación usando bacterias (Ohtake et al. 1990, Coleman and Paran, 1991, etc), suelos (Losi et al, 1994), algas (Brady et al., 1994) y plantas (Wolverton & Mc Donald, 1979; Martin & Coughtrey, 1982; de Wet et al, 1990; Delgado et al., 1993; Sen & Battacharyya, 1994; Dushenkov et al., 1995, Salt et al, 1997, Lytle et al, 1998, Maine et al. 1998, Schneider and Rubio,1999). El uso de plantas acuáticas, o fitoremediación, aparece como una opción altamente competitiva frente a otros métodos de tratamiento de aguas residuales. Obviamente la eficiencia de los mismos dependerá en gran medida de las macrófitas que se utilicen (Reddy, 1983, Gersberg *et. al.*, 1986). Se necesitan entonces plantas acuáticas que presenten alta eficiencia y alta tolerancia a concentraciones elevadas del contaminante que se quiere eliminar. Se ha propuesto que las plantas pueden ser cosechadas y su tejido, rico en el contaminante acumulado, puede ser procesado para producir energía y los metales pueden ser recuperados de los residuos de las plantas después de un tratamiento ácido (Dushenkov et al, 1995). A pesar que en muchos casos no es económicamente factible el reciclado de metales, sigue siendo más económico disponer de una pequeña cantidad de biomasa contaminada que de una gran cantidad de residuos sólidos o semisólidos.

El valle de inundación del Paraná medio se caracteriza por sus zonas pantanosas, humedales o wetlands, donde se desarrollan una gran variedad de macrófitas. Entre las especies flotantes libres de mayor dispersión y productividad se encuentran: *Salvinia herzogii*, *Pistia stratiotes*, *Hydromistia stolonífera* y *Eichhornia crassipes*. Se ha propuesto la utilización de humedales naturales como sistemas de tratamiento de aguas residuales cloacales y domiciliarias, pero su uso podría traer aparejado daños ambientales. Otra desventaja de los wetlands naturales es que difícilmente estén disponibles en lugar donde

debe llevarse a cabo el tratamiento. Por ello se ha implementado la utilización de humedales artificiales. Un humedal artificial es un ambiente constituido por una zona deprimida donde se desarrollan plantas acuáticas flotantes y arraigadas sobre sedimentos permanentemente inundados donde se induce un flujo artificial de agua (Hammer y Bastion, 1989; De Luis Calabuig, 2001). El uso de wetlands construidos tiene muchas ventajas ya que pueden construirse donde se necesitan, dimensionarse de acuerdo a las necesidades del tratamiento, impermeabilizarse para evitar la contaminación de las napas y además el costo inicial de construcción, como así también el costo anual de operación, para uso como tratamiento primario o secundario es mucho menor que el de los tratamientos convencionales. Los wetlands construidos además de eliminar eficientemente contaminantes, son proyectos amigables con el medio ambiente, que proveen un habitat para vegetación, peces, aves y otros tipos de vida silvestre. La mayoría de las investigaciones sobre el tema han sido realizadas en el exterior y muy pocas en la Argentina, a pesar de representar una práctica muy promisoría, ya que en nuestro país, existe una baja densidad de población y gran disponibilidad de terrenos marginales de bajo costo para implementar este tipo de técnica. Otro factor importante en la construcción de humedales es el clima. Nuestra región tiene un clima templado, adecuado para desarrollar este tipo de sistemas. En países con clima frío, presentan dos problemas principales: fallas hidráulicas debidas al congelamiento o cambios en la viscosidad del efluente e inadecuada purificación debido a las bajas temperaturas (Jenssen et al., 1993).

Esta tecnología “natural” se ha establecido firmemente para el tratamiento de aguas residuales. A juzgar por el creciente número de humedales naturales y construidos utilizados para el tratamiento de aguas residuales, principalmente cloacales, estos sistemas constituyen una nueva y promisoría tecnología que ya ha sido aceptada en la mayor parte del mundo. Sin embargo, es un método de tratamiento no tradicional y además su

tecnología no está aún completamente entendida. El conocimiento de cómo trabaja un wetland no está tan avanzado como para proveer modelos predictivos de funcionamiento detallados, ya que es un sistema natural sujeto a cambios climáticos y ciclos vegetativos (Cole, 1998). Para desarrollar criterios de diseño, se debe mejorar la comprensión de los principales procesos de este complejo sistema natural. Como las plantas son el principal componente biológico, son ellas, en gran medida, las que determinan la estructura y el funcionamiento de estos ecosistemas (Wetzel & Corners, (1979), Carpenter (1986)). Sin embargo, los estudios que se han llevado a cabo hasta el momento en el mundo sobre macrófitas para eliminación de contaminantes, abocan sus esfuerzos en determinar las eficiencias de remoción de contaminantes o los efectos tóxicos que los contaminantes producen sobre las plantas, sin detenerse en los procesos por los cuales las macrófitas llevan a cabo la bioacumulación de metales, que como se dijo, es el conocimiento clave tanto para entender el comportamiento de la planta como para optimizar sistemas de tratamiento de agua. Se ha propuesto que los mecanismos que utiliza la planta para la remoción del metal no son necesariamente los mismos para las diferentes especies de plantas y para los diferentes metales. Dentro de estos mecanismos se encuentran: la sorción por raíces (una combinación de procesos físicos y químicos como quelación, intercambio iónico y precipitación química), los procesos biológicos que incluyen la traslocación a la parte aérea y la precipitación inducida por exudados de raíces o por microorganismos.

Los conocimientos sobre los mecanismos de absorción y translocación del Cr son poco claros y a veces contradictorios. La principal dificultad para conocer estos mecanismos estriba en el escaso conocimiento que todavía se tiene acerca de la identidad bioquímica y el funcionamiento de los translocadores iónicos, de los procesos de intercambio iónico en general, de los cambios de estado de oxidación del Cr y de las fuertes diferencias en el comportamiento biológico de ambas formas Cr(III) y Cr(VI).

Kleiman y Cogliatti (1998), concluyeron en estudios realizados utilizando varias especies de plantas terrestres creciendo en soluciones de cultivo adicionadas con Cr(III), que éste es removido por las raíces de estas plantas desde la solución de cultivo, a través de tres caminos: absorción (transporte a través del plasmalema dentro de la célula), adsorción (fijación a las cargas negativas de las paredes celulares) y precipitación (formación de óxidos e hidróxidos cuando aumenta el pH de la solución). Además pueden producirse reacciones redox en el microambiente de las raíces, como por ejemplo que el Cr(VI) se reduzca a Cr(III) para luego ser tomados por la planta, lográndose un proceso de detoxificación. (Lyltle et al, 1998).

Cutler y Rains (1974) investigaron la toma de cadmio por raíces escindidas de cebada desde una solución de cultivo. En un experimento de corta duración, hipotetizaron que la toma de cadmio por raíces de cebada, involucra tres mecanismos. El primero es adsorción de intercambio, en la cual el cadmio es reversiblemente unido a los sitios de intercambio de las raíces y puede ser rápidamente intercambiado por soluciones de desorción (soluciones que contengan un gran exceso de otro metal de transición, por ej, Zn, Cu, Hg.) o soluciones de Ca. El segundo mecanismo propuesto es uno irreversible, enlace no metabólico o secuestrante en un número limitado de sitios de la pared celular o macromoléculas de la célula. El tercer mecanismo, la difusión, se produce por un movimiento a través de la membrana celular. Resultados similares se obtuvieron en experimentos de corta duración en solución de cultivo realizadas por Jarvis et al. (1976). La toma de cadmio disminuyó en raíces de plantas de centeno de 10-15 semanas de edad por la presencia de Ca^{+2} , Mn^{+2} , o Zn^{+2} en solución, concluyendo que estos cationes pueden inhibir la toma de cadmio por competencia por los sitios de intercambio sobre la superficie de la raíz y por un efecto sobre las membranas celulares. Estos investigadores también

encontraron que el cadmio podría ser rápidamente liberado desde las raíces de centeno por desorción en soluciones conteniendo Ca^{+2} , Mn^{+2} , o Zn^{+2} .

La mayoría de las investigaciones fueron realizadas en plantas terrestres creciendo hidropónicamente y poco se conoce de los procesos de sorción de metales pesados por macrófitas acuáticas. Por lo expuesto, conocer estos mecanismos permitirá mejorar estas técnicas de eliminación de contaminantes.

1.6. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- A- Determinar la eficiencia de remoción de Cr y Cd de diferentes macrófitas flotantes regionales.
- B- Seleccionar dos especies que demuestren poseer la mayor eficiencia de remoción.

Una vez seleccionadas las especies vegetales a utilizar, sobre ellas se plantea:

- 1- Estudiar la capacidad de bioacumulación a diferentes concentraciones de Cr y Cd.
- 2- Determinar la distribución de Cr y Cd en las distintas partes de la planta.
- 3- Estudiar el efecto de la cantidad de biomasa vegetal en la remoción del metal.
- 4- Determinar la eficiencia de sorción de Cr y Cd de masa viva y no viva.
- 5- Estudiar los procesos de sorción del metal por las raíces.
- 6- Estudiar la traslocación del metal dentro de la planta.

- 7- Estudiar si la presencia o ausencia de microorganismos afecta la remoción de Cr.
- 8- Plantear un modelo cinético para la sorción de Cr y Cd.
- 9- Validar los conocimientos adquiridos en el seguimiento de un wetland experimental a escala piloto para tratamiento de un efluente real de industria metalúrgica.

2- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestras

El agua y las plantas utilizadas en las experiencias se recolectaron en un ambiente representativo no contaminado de la llanura de inundación del Río Paraná Medio, ubicado a la altura del kilómetro 14, Comuna de Arroyo Leyes, de la Ruta Provincial N° 1, que une las ciudades de Santa Fe y San Justo. Las características fisicoquímicas del agua se presentan en el Anexo I.

Se eligieron plantas en buenas condiciones y con similar estado de crecimiento, tamaño, longitud de raíces y color de hojas. Después de su recolección, se lavaron siempre cuidando no dañar sus tejidos (para eliminar sedimentos y otros vegetales) y se aclimataron en invernadero antes de la experiencia durante 3 días.

Las experiencias se llevaron a cabo en invernáculo con temperatura y fotoperíodo natural durante el tiempo de experimentación. El invernáculo posee un techo traslúcido de fibra de vidrio.

Para todas las experiencias se utilizaron acuarios plásticos ya que se ha demostrado que es el material que posee menor capacidad de adsorción de metales (Prakash et al, 1987), de 10 litros de capacidad y fueron dispuestos por triplicado. El Cd se adicionó en forma de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, el Cr(III) como $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y el Cr(VI) como $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

A fin de chequear la pérdida de Cr ó Cd por el sistema experimental debido a la adsorción sobre las paredes del acuario, o reacciones químicas, se dispusieron acuarios control químico sin plantas y además acuarios control biológico, colocando cada macrófita en agua de laguna sin adición de metal.

Se controló el volumen de agua en los acuarios, adicionando agua destilada para reponer el agua perdida por evaporación y evapotranspiración, manteniendo de esta forma el volumen constante. Todos los tratamientos se dispusieron por triplicado.

2.2. Metodología analítica empleada

2.2.1. Determinaciones analíticas en agua

Las determinaciones analíticas se llevaron a cabo utilizando técnicas normalizadas (APHA, 1998). Las concentraciones de cadmio y cromo fueron analizadas utilizando un Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer 5000 atomización por llama aire – acetileno a una longitud de onda de 228,8 nm para cadmio y 357.9 nm para cromo (APHA, 1998). Las determinaciones fueron llevadas a cabo en el Secegrin del Ceride, Santa Fe.

Las concentraciones de Cr(VI) en agua se determinaron por el método colorimétrico que utiliza como reactivo cromógeno difenilcarbazida.

La conductividad se midió con un conductímetro YSI modelo 33, el OD con un oxímetro Horiba OM-14 y el pH con un peachímetro Orion.

Los sólidos totales disueltos se determinaron por evaporación de 50 ml de agua en cápsula de porcelana y secado en estufa a 180°C hasta pesada constante.

El nitrito se determinó por diazotación acoplada seguida de la técnica colorimétrica. El amonio y nitrato se determinaron por potenciometría (electrodos selectivos de iones Orion Ion plus 93-07, sensibilidad: 0,01 mg l⁻¹ de N, reproducibilidad: ± 2%). El Ca y el Mg se determinaron por titulación con EDTA. El sodio y el potasio se determinaron por fotometría de emisión de llama. El carbonato y bicarbonato se determinaron por volumetría

ácido-base con hidróxido de sodio usando fenolftaleína y verde de bromo cresol como indicadores. La dureza total se determinó por volumetría quelatométrica con EDTA trabajando a pH=10 y usando NET como indicador. El cloruro se determinó por el método argentométrico. El sulfato se determinó por turbidimetría. La DQO se determinó por el método de reflujo abierto y la DBO por el test de 5 días. El fósforo reactivo soluble (PRS) se determinó mediante la técnica colorimétrica de azul de molibdeno (Murphy y Riley, 1962) (Espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 20). El fósforo total (PT) se determinó por digestión de la muestra con ácido nítrico y ácido sulfúrico, neutralización y determinación de fosfato por el método de Murphy y Riley (1962). Fe, Ni y Zn se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica (por llama o atomización electrotérmica, según la concentración de la muestra, Perkin Elmer 5000).

2.2.2. Determinaciones analíticas en vegetales

Las determinaciones de Cr y Cd se realizaron, previa digestión con mezcla ácida de $\text{HClO}_4:\text{HNO}_3:\text{HCl}$ (5:3:2), por espectrofotometría de absorción atómica con llama o con horno de grafito (Instrumento: Perkin Elmer 5000) (APHA, 1998). Las plantas se separaron en sus partes aéreas (tallos y hojas) y sumergidas (lacinias o raíces), colocándolas en estufa a 70° C antes de realizar la digestión ácida. (Westlake, 1974).

Para determinar peso seco, las plantas se separaron en sus partes aéreas (tallos y hojas) y sumergidas (rizomas y raíces de especies emergentes y raíces de especies flotantes) en el laboratorio, colocándolas en estufa a 105° C hasta peso constante (APHA, 1998).

Se determinaron en todas las experiencias las tasas de crecimiento relativo según la ecuación propuesta por Hunt (1978):

$$R = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{T_2 - T_1}$$

donde R = tasa de crecimiento relativo ($g\ g^{-1}\ día^{-1}$), W_1 y W_2 = pesos secos inicial y final, respectivamente, y $T_2 - T_1$ = tiempo de experimentación.

2.3. Análisis estadístico

Para diferenciar los valores se realizaron tests de comparaciones de medias. La determinación de diferencias estadísticamente significativas se llevó a cabo realizando análisis de la varianza (ANOVA). El test de Duncan se utilizó para diferenciar medias donde fue necesario. Un nivel de $p < 0,05$ se utilizó en todas las comparaciones. La normalidad de los residuales se realizó gráficamente. Se utilizó el test de Bartlett para homocedasticidad, para corroborar si las variancias fueron homogéneas (Walpole y Myers, 1999). Los cálculos se efectuaron utilizando el software Statgraphics Plus 3.0.

3. EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE Cr Y Cd DE DIFERENTES MACRÓFITAS FLOTANTES REGIONALES.

3.1. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

3.1.1. Elección de las macrófitas

A fin de evaluar la eficiencia de un grupo de macrófitas se realizó una preselección de las especies teniendo en cuenta los criterios planteados por Mitchell (1978) y Boyd (1970): crecimiento rápido y fácil dispersión, alta capacidad de absorción de nutrientes y otras sustancias; velocidad de crecimiento relativamente constante, tolerancia a las condiciones hipereutróficas, fácil cosecha y preferiblemente posibilidad de alguna utilización posterior.

Utilizando estos criterios, se preseleccionaron las especies: *Salvinia herzogii*, *Pistia stratiotes*, *Hydromistia stolonífera* y *Eicchornia crassipes*.

3.1.2. Metodología

La experiencia se llevó a cabo en invernadero con fotoperíodo natural, a una temperatura de 25-28 °C, durante el tiempo de experimentación.

Se dispusieron acuarios conteniendo 100 g de macrófita húmeda y 8 l de agua recolectada en el mismo lugar físico donde se muestrearon las macrófitas. El agua se utilizó sin pretratamientos. Los acuarios se dispusieron por triplicado. Se presentan los valores medios.

3.1.2.1. Experiencia 3.1.

A cada acuario se adicionó $(\text{NO}_3)_2\text{Cd}$ de forma que la concentración en agua fuera de aproximadamente $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de Cd. Se utilizó un acuario como blanco que contenía el agua, adicionada con Cd, pero sin macrófitas. Se midió la concentración de Cd en agua a: 0 y 10 hs, 1, 2, 5, 8, 14 y 21 días; los acuarios se mantuvieron a un pH de 6,8 -7.

3.1.2.2. Experiencia 3.2.

A cada acuario se adicionó $(\text{NO}_3)_3\text{Cr}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ de forma que la concentración de Cr fuera de aproximadamente $0,5 \text{ mg l}^{-1}$. Se utilizó como blanco o referencia un acuario conteniendo agua adicionada sin macrófitas. Se midió la concentración de Cr a los siguientes tiempos: 0 y 10 hs, 1,2,5,8,14 y 21 días; los acuarios se mantuvieron a un pH de 6,2-6,5. En ambas experiencias los acuarios se controlaron diariamente para evaluar el estado de las macrófitas y observar si existían síntomas de fitotoxicidad del Cd y Cr sobre las distintas especies.

Al final de las experiencias las macrófitas se tomaron en forma completa, sin diferenciar entre parte aérea y sumergida, se trituraron y homogeneizaron. Sobre las muestras originales y finales de macrófitas se determinó Cd (experiencia 3.1.) y Cr total (experiencia 3.2.) por triplicado para cada acuario. Se presentan valores medios.

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 3.1. muestra las concentraciones de Cd en agua, en los acuarios conteniendo las distintas especies de macrófitas. Los resultados muestran en todos los acuarios una importante disminución en la concentración de Cd; la que se produjo fundamentalmente durante las primeras 24 hs. Los porcentajes de remoción de Cd en

agua a los 21 días de exposición fueron de: *S. herzogii*: 84 %, *P. stratiotes*: 87%, *E. crassipes*: 72 % e *Hydromistia stolonifera*: 76 %. (Tabla 3.1.1)

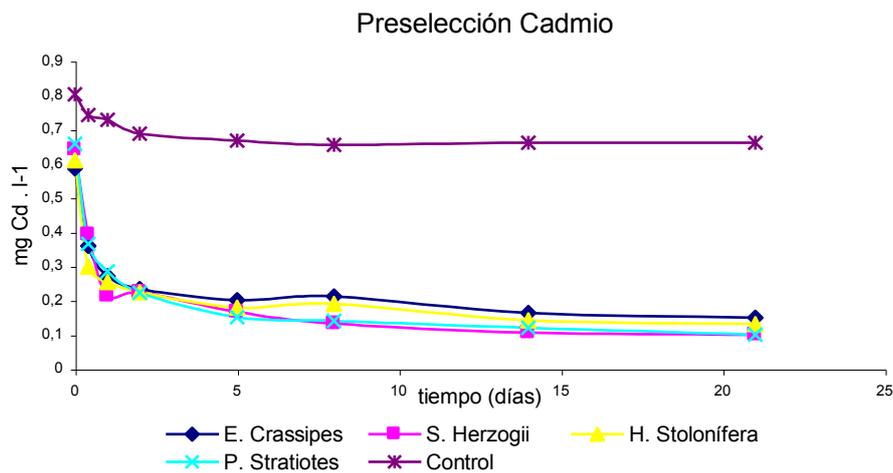


Figura 3.1.: Disminución de la concentración de Cd en el agua, para la exposición de distintas macrófitas en función del tiempo.

Si se comparan los acuarios que contienen a las distintas especies acuáticas, con el acuario blanco a través de la aplicación del test de Dunett (Walpole y Myers, 1992) a las concentraciones finales de Cd en agua, se concluye que existe diferencia significativa con el acuario control ($\alpha = 0,05$). En consecuencia, se puede proponer que la disminución de Cd en los acuarios con macrófitas se debe fundamentalmente a la sorción de Cd por los vegetales.

No existió diferencia significativa en la remoción de Cd al finalizar la experiencia entre los acuarios conteniendo las distintas especies de macrófitas (ANOVA, $p < 0.05$). Todas las especies fueron altamente eficientes en la sorción de Cd.

Tabla 3.1.1: Porcentajes medios de remoción de Cd en los distintos acuarios a los 21 días de experiencia.

Especie	% de Remoción
<i>Eichhornia crassipes</i>	72
<i>S. herzogii</i>	84
<i>Hydromistia stolonifera</i>	76
<i>Pistia stratiotes</i>	87

En la Tabla 3.1.2. se encuentran resumidos los valores correspondientes a la concentración final de Cd en macrófitas. Las concentraciones de Cd en todas las especies vegetales al final de la experiencia fueron significativamente superiores a las concentraciones iniciales (test de comparación de medias, $p < 0,05$).

Tabla 3.1.2.: Concentración de Cd (mg/g) en el tejido vegetal de las macrófitas y tasa de crecimiento relativa promedio (R).

Especies	Conc. Inicial (mgCd g ⁻¹)	Conc. Final (mgCd g ⁻¹)	R.10 ⁻⁴
<i>Eichhornia crassipes</i>	7,91.10 ⁻³	0,757	6.23
<i>S. herzogii</i>	9,82.10 ⁻³	0,954	10.5
<i>Hydromistia stolonifera</i>	7,11.10 ⁻³	0,829	-8.8
<i>P. stratiotes</i>	8,86.10 ⁻³	0,728	10.8

Se encontró una concentración de Cd significativamente superior en tejido vegetal en la especie *S. herzogii*, seguida de *Hidromistia stolonifera*, siendo las concentraciones en las especies *Eichhornia crassipes* y *Pistia stratiotes* significativamente inferiores.

P. stratiotes expuesta al Cd mostró un gran desarrollo del aparato radical y buena reproducción, mientras que *S. herzogii*, presentó lacinias gomosas y poca brotación. *E. crassipes* tuvo poca adaptación al medio. Las tasas de crecimiento relativas promedio (Tabla 3.1.2.) para *S. herzogii* y *P. stratiotes* fueron estadísticamente superiores a las demás. *H. stolonifera* presentó una tasa de crecimiento negativa, con un evidente deterioro en su tejido

En la Figura 3.2 se puede observar la reducción de la concentración de Cr en los acuarios que contenían las distintas macrófitas. Los resultados muestran en todos los acuarios una importante disminución en la concentración de Cr, la que se produjo principalmente durante las primeras 24 horas. Los porcentajes de remoción a los 21 días de exposición fueron en *S. herzogii*: 78%, *E. crassipes*: 77 %, *P. stratiotes*: 75% e *Hydromistia stolonifera*: 60 % (Tabla 3.2.1).

Aplicando el test de Dunett a las concentraciones finales de Cr en agua obtenidas en los acuarios con las distintos macrófitas y el acuario control sin macrófitas, se concluye que existe diferencia significativa ($\alpha = 0,05$) con el acuario control, pudiendo proponerse que la disminución de Cr en los acuarios con macrófitas se debe fundamentalmente a la sorción de Cr por los vegetales.

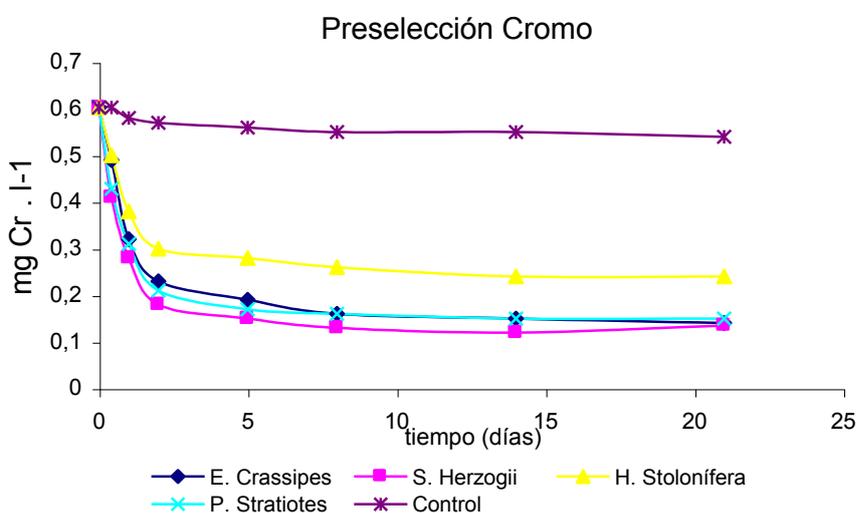


Figura 3.2.: Disminución de la concentración de Cr en el agua, para la exposición de distintas macrófitas en función del tiempo.

Se verificó que existe diferencia significativa en la concentración de Cr al finalizar la experiencia en los distintos acuarios que contenían las diferentes especies (ANOVA, $p <$

0,05). Aplicando el Test de Duncan con un nivel de confianza del 95 %, se determinó que la concentración de Cr en el acuario conteniendo la especie *H. stolonifera* es significativa diferente a las concentraciones de Cr en los demás acuarios, no existiendo entre estos diferencias significativas.

Tabla 3.2.1. Porcentajes medios de remoción de Cr en agua en los distintos acuarios con macrófitas.

Especie	% de Remoción
<i>Eichhornia crassipes</i>	77
<i>S. herzogii</i>	78
<i>Hydromistia stolonifera</i>	60
<i>Pistia stratiotes</i>	75

La Tabla 3.2.2. presenta las concentraciones de Cr en las diferentes macrófitas a los 21 días de experiencia. En todas las especies vegetales hubo un incremento significativo de la concentración del metal respecto a la concentración inicial (test de comparación de medias, $p < 0,05$). La concentración de Cr en tejido vegetal fue significativamente superior en *P. stratiotes*. Las concentraciones en las especies *S. herzogii* y *E. crassipes* no mostraron diferencia significativa entre si. La especie *H. stolonifera* alcanzó una concentración significativamente menor a las restantes, alrededor del 50 %. (Anova, $p < 0,05$).

Tabla 3.2.2.: Concentración media de Cr (mg/g) en el tejido vegetal de las macrófitas y tasa de crecimiento relativa promedio (R).

Especie	Conc. Inicial (mgCr g ⁻¹)	Conc. Final (mgCr g ⁻¹)	R. 10 ⁻⁴
<i>Eichhornia crassipes</i>	5,12.10 ⁻³	0,786	10,7
<i>S. herzogii</i>	7,51.10 ⁻³	0,793	11,9
<i>Hydromistia stolonifera</i>	4,9. 10 ⁻³	0,490	-48,9
<i>P. stratiotes</i>	2,17.10 ⁻²	0,913	11,7

Las tasas de crecimiento relativas promedio (Tabla 3.2.2.) para *S. herzogii* y *P. stratiotes* fueron estadísticamente superiores a las demás, siendo la especie *H. stolonifera*

la única que presentó tasa de crecimiento negativa, con visibles síntomas de fitotoxicidad. *P. stratiotes* presentó necrosis de tejido en las plantas maduras pero desarrolló una importante cantidad de plantas jóvenes.

3.3. CONCLUSIONES

- Las especies vegetales *S. herzogii*, *P. stratiotes* y *E. crassipes* fueron eficientes en la absorción de Cd y Cr, siendo *S. herzogii* y *P. stratiotes* las especies que mostraron mayor tolerancia a la exposición a los metales estudiados, por lo que se seleccionan para realizar los estudios planteados.



P.stratiotes



S. herzogii

4. EFECTO DE LA CANTIDAD DE BIOMASA VEGETAL EN LA REMOCIÓN DEL METAL DE LA SOLUCIÓN

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

A fin de evaluar el efecto de la masa de macrófitas utilizadas en la remoción de contaminante y así determinar la mejor relación biomasa/solución, se realizaron simultáneamente cuatro experiencias.

En cada una de ellas se dispusieron 8 acuarios conteniendo 7 litros de agua. La experiencia se realizó en invernáculo con fotoperíodo natural durante el mes de setiembre. La duración de las experiencias fue de 48 horas, ya que se en la experiencia anterior se observó que en ese tiempo se produce la mayor sorción. Se estudiaron 2 concentraciones de Cr y Cd en agua. El esquema de las experiencias fue el siguiente:

Tratamiento	2 mg l-1	6 mg l-1
25 g	X	X
50 g	X	X
100g	X	X
200 g	X	X

En cada experiencia los acuarios se dispusieron por triplicado, informándose a continuación los valores medios.

Experiencia 4.1: La especie utilizada fue *S. herzogii*. Se agregó $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ lográndose una concentración de $2,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cr}$ y $6,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cr}$ respectivamente.

Experiencia 4.2.: La especie utilizada fue *S. herzogii* y se agregó $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Se obtuvieron como concentraciones iniciales $1,6 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$ y $5,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$ respectivamente.

Experiencia 4.3.: La especie utilizada fue *P. stratiotes*. Se agregó $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$ lográndose una concentración de $2,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cr}$ y $5,7 \text{ mg l}^{-1} \text{ C}$ respectivamente.

Experiencia 4.4.: La especie utilizada fue *P. stratiotes* y se agregó $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Se obtuvieron como concentraciones iniciales $2,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$ y $6,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$ respectivamente.

Se determinaron las concentraciones de Cr y Cd en agua a: 0, 1, 2, 8, 24 y 48 horas.

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1. Experiencia 4.1.

Las Figuras 4.1.a. y 4.1.b. muestran la disminución en la concentración de Cr en los diferentes tratamientos con diferentes masas de *S. herzogii*. Para las dos concentraciones estudiadas se observa una disminución significativamente mayor en los acuarios que contenían mayor masa de macrófita (Anova, 3 factores: biomasa, concentraciones y tiempo).

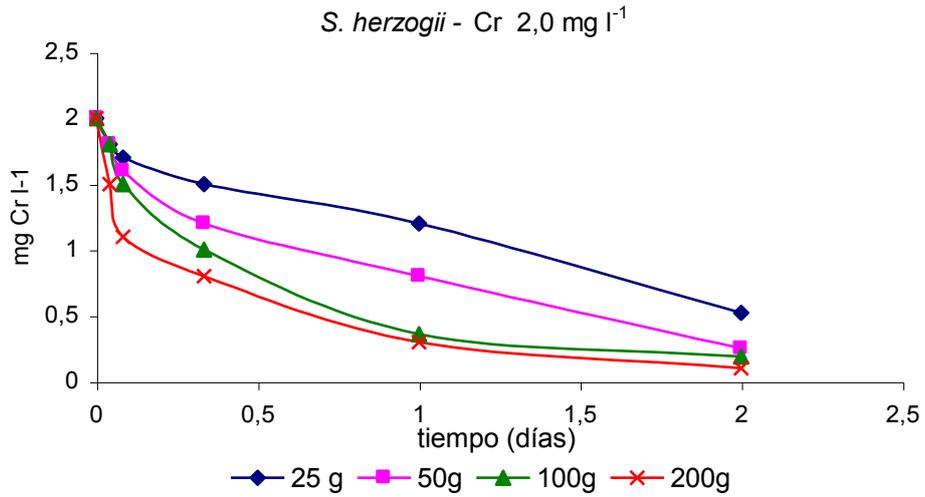


Figura 4.1.a.: Concentración de Cr en agua en los acuarios conteniendo las distintas masas de *S. herzogii* en función del tiempo. Concentración inicial 2,0 mg l⁻¹ Cr.

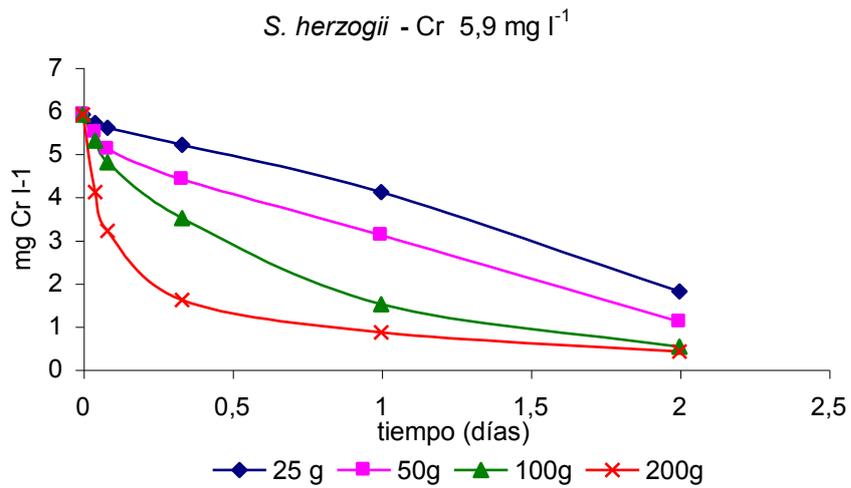


Figura 4.1.b.: Concentración de Cr en agua en los acuarios conteniendo las distintas masas de *S. herzogii* en función del tiempo. Concentración inicial 5,9 mg l⁻¹ Cr.

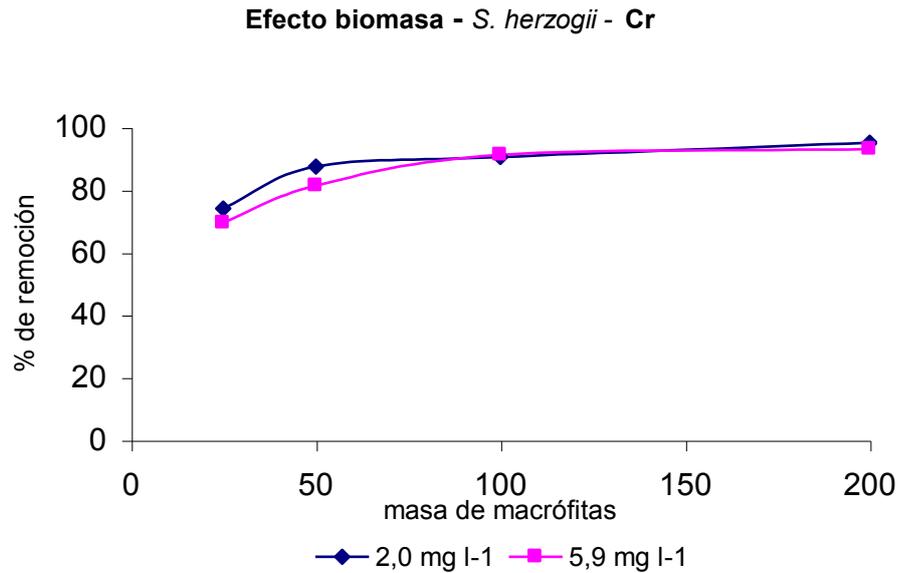


Figura 4.1.c.: Porcentajes de remoción de Cr en los distintos acuarios con diferentes masas de *S. herzogii* a las dos concentraciones estudiadas.

La Figura 4.1.c. muestra los porcentajes de remoción de Cr a las 48 horas en los diferentes acuarios a las dos concentraciones estudiadas. No hubo diferencias significativas en la remoción final de Cr entre las dos concentraciones iniciales de Cr utilizadas. En cambio, existieron diferencias entre las distintas masas utilizadas (ANOVA, dos factores: concentración inicial de Cr y masa de macrófitas, $p < 0,05$). El mismo análisis indicó que la interacción entre los dos factores influye significativamente en la remoción de Cr. Como la interacción es significativa, se aplica la prueba de intervalos múltiples de Duncan con un nivel de confianza del 95 %, para los datos de porcentajes de remoción a cada concentración para cada nivel del otro factor (masas de macrófitos utilizadas). Este análisis indica que en los acuarios con 100 g de macrófitas, el porcentaje de remoción entre las concentraciones nominales de 2 y 6 mg l⁻¹ no es significativamente diferente, siendo significativamente diferente para los acuarios conteniendo 25 g, 50 g y 200 g. De la misma forma aplicando Duncan para cada una de las concentraciones iniciales utilizadas, se obtiene en los dos casos (2 y 6 mg l⁻¹) que existe diferencia significativa en los

porcentajes de remoción de los acuarios con diferentes masas, determinándose dos grupos homogéneos uno formado por los acuarios con 25 y 50 g y otro por los acuarios con 100g y 200 g.

Como auxiliar en la interpretación de los resultados resulta útil la construcción de una gráfica de los porcentajes de remoción promedio de cada combinación de tratamiento. La Figura 4.1.d. muestra un gráfico de interacciones entre los distintos factores en la remoción de Cr, a modo de ejemplo. La interpretación de esta gráfica conduce a los mismos resultados que la prueba de intervalos múltiples de Duncan.

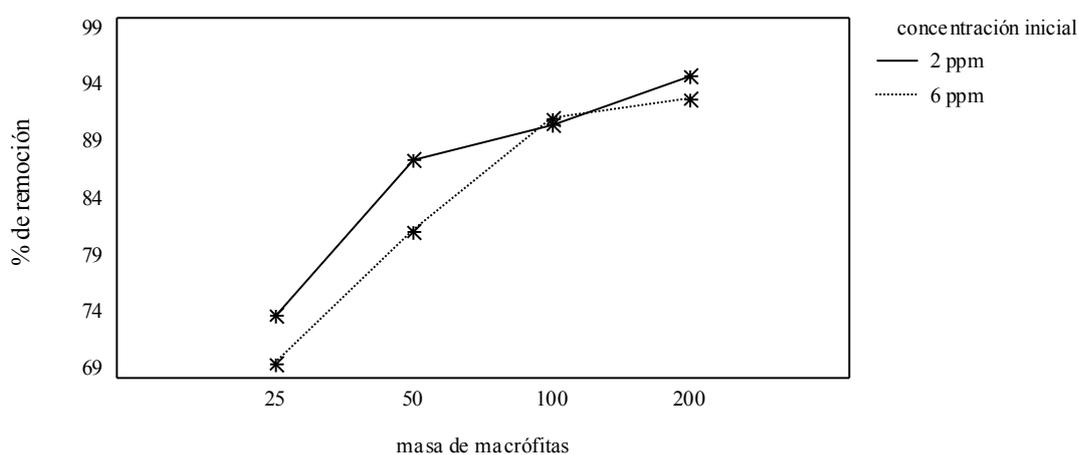


Figura 4.1.d.: Interacción entre la concentración inicial de Cr utilizada y la masa de macrófitas en los porcentajes de remoción de Cr en agua.

4.2.2. Experiencia 4.2.

Las Figuras 4.2.a. y 4.2.b. muestran la disminución en la concentración de Cd en los distintos acuarios con diferentes masas de *S. herzogii*. A las dos concentraciones estudiadas se observa una mayor disminución en aquellos que contenían mayor masa de macrófita. A las 48 horas, las concentraciones de Cd en los acuarios con diferentes masas,

tanto para la concentración inicial de $1,60 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$ como para $5,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$, fueron estadísticamente diferentes (ANOVA, $p < 0,05$). Aplicando el test de Duncan con un nivel de confianza del 95 % se determinó que existe diferencia significativa entre todos los acuarios con diferentes masas de macrófitas, nuevamente determinándose dos grupos homogéneos uno formado por los acuarios con 25 y 50 g y otro por los acuarios con 100g y 200 g.

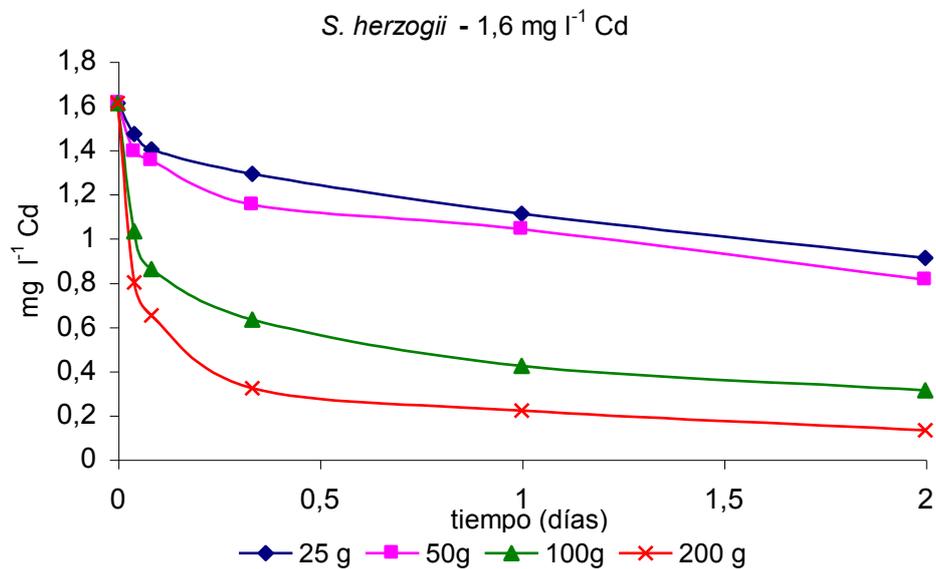


Figura 4.2.a. : Concentración de Cd en agua en los acuarios conteniendo las distintas masas de *S. herzogii* en función del tiempo. Concentración inicial $1,6 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$.

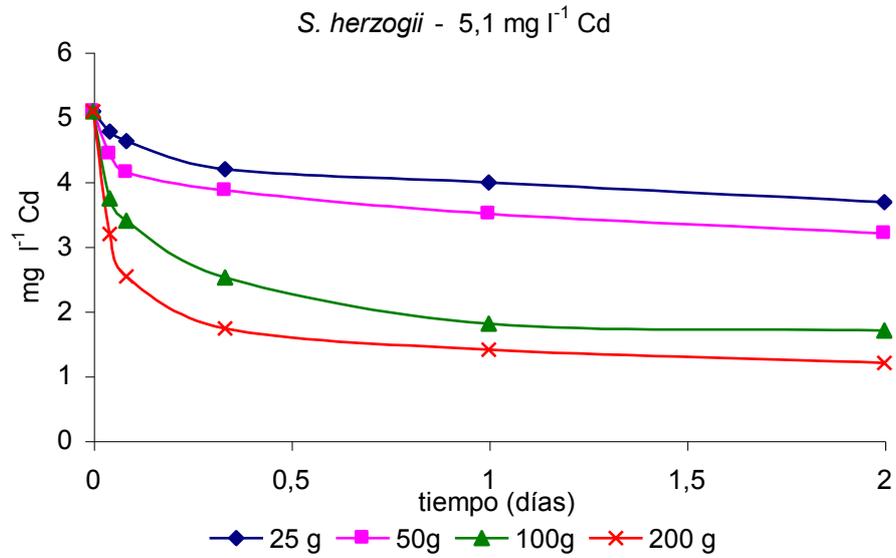


Figura 4.2.b.: Concentración de Cd en agua en los acuarios conteniendo las distintas masas de *S. herzogii* en función del tiempo. Concentración inicial 5,1 mg l⁻¹ Cd.

La Figura 4.2.c. muestra los porcentajes de remoción de Cd al final de la experiencia (48 horas) en los diferentes acuarios a las dos concentraciones estudiadas. Existen diferencias significativas en la remoción de Cd de aguas, tanto entre los acuarios con diferentes masas de macrófitas, como para las dos concentraciones estudiadas (ANOVA, dos factores: concentración inicial de Cd y masa de macrófitas, $p < 0,05$).

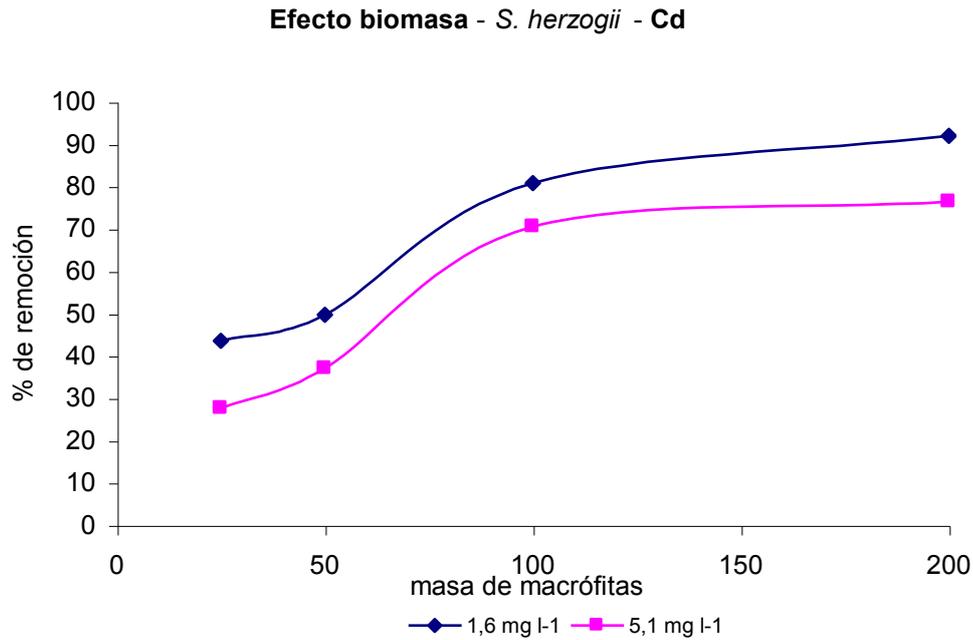


Figura 4.2.c.: Porcentajes de remoción de Cd en los distintos acuarios con diferentes masas de *S. Herzogii* a las dos concentraciones estudiadas.

El mismo análisis determinó que la interacción entre los factores es estadísticamente significativa. Aplicando la prueba de intervalos múltiples de Duncan, con un nivel de confianza del 95 %, interacciones significativas y para todas las comparaciones posibles, se obtiene en que los porcentajes de remoción en los acuarios son significativamente diferentes, con excepción de los acuarios con 100g y 200 g.

4.2.3. Experiencia 4.3.

Las Figuras 4.3.a. y 4.3.b. muestran la disminución en la concentración de Cr en los distintos acuarios con diferentes masas de *P. stratiotes*. A las dos concentraciones estudiadas se observa una mayor disminución en aquellos que contenían mayor masa de macrófita. A las 48 horas, las concentraciones de Cr en los acuarios con diferentes masas, tanto para la concentración inicial de 2 mg l⁻¹ Cr como para 5,7 mg l⁻¹ Cr, fueron

estadísticamente diferentes (ANOVA, $p < 0,05$). Aplicando el test de Duncan con un nivel de confianza del 95 % se determinó que existe diferencia significativa entre todos los acuarios con diferentes masas de macrófitas, para las dos concentraciones estudiadas.

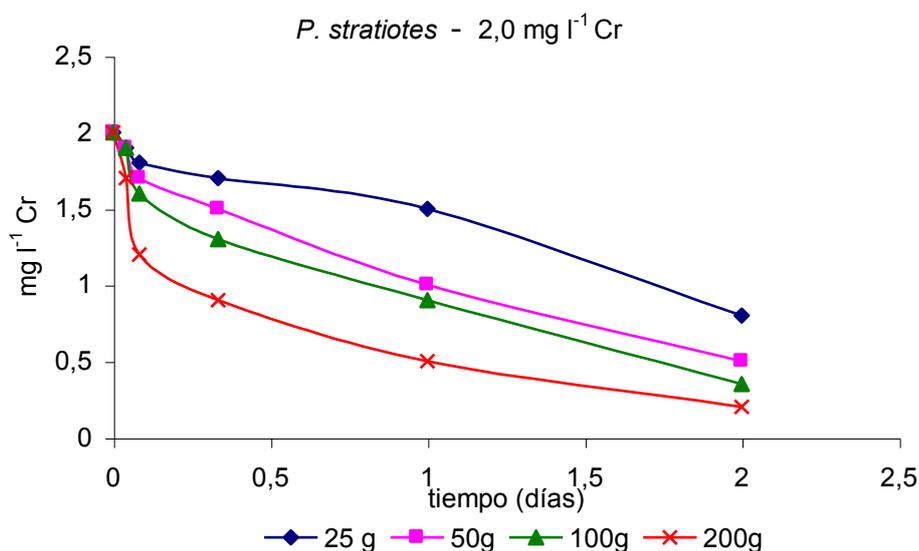


Figura 4.3.a.: Concentración de Cr en agua en los acuarios conteniendo las distintas masas de *P. stratiotes* en función del tiempo. Concentración inicial 2,0 mg l⁻¹ Cr.

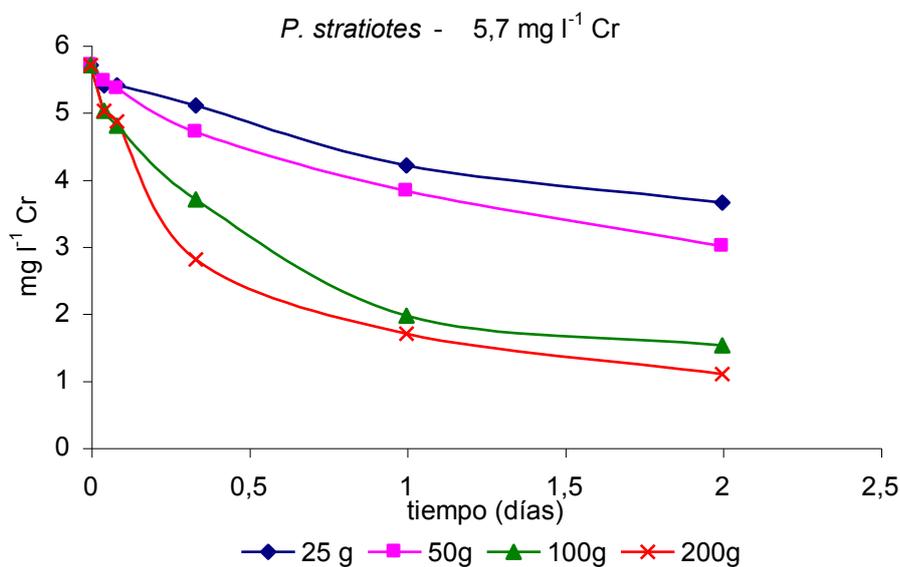


Figura 4.3.b.: Concentración de Cr en agua en los acuarios conteniendo las distintas masas de *P. stratiotes* en función del tiempo. Concentración inicial 5,7 mg l⁻¹ Cr.

La Figura 4.3.c. muestra los porcentajes de remoción de Cr a las 48 horas en los diferentes acuarios a las dos concentraciones estudiadas. Existen diferencias significativas en la remoción de Cr de aguas, tanto entre los acuarios con diferentes masas de macrófitas, como para las dos concentraciones estudiadas (ANOVA, dos factores: concentración inicial de Cr y masa de macrófitas, $p < 0,05$).

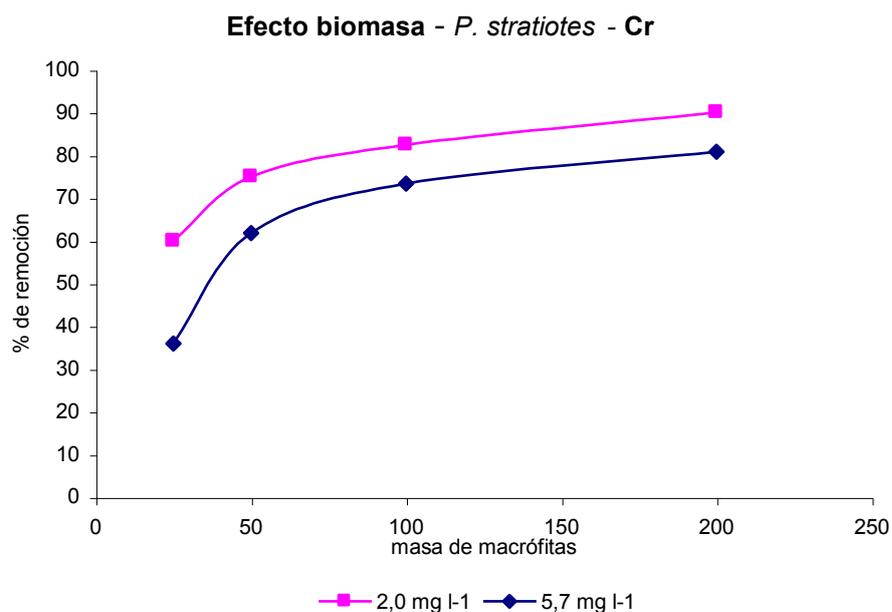


Figura 4.3.c.: Porcentajes de remoción de Cr en los distintos acuarios con diferentes masas de *P. stratiotes* a las dos concentraciones estudiadas.

Al igual que en la experiencia anterior, la interacción entre los factores es estadísticamente significativa. Aplicando la prueba de intervalos múltiples de Duncan, con un nivel de confianza del 95 %, interacciones significativas y para todas las comparaciones posibles, se obtiene en todos los casos que los porcentajes de remoción en todos los acuarios son significativamente diferentes.

4.2.4. Experiencia 4.4.

Las Figuras 4.4.a. y 4.4.b. muestran la disminución en la concentración de Cd en los distintos acuarios con diferentes masas de *S. herzogii*. A las dos concentraciones

estudiadas se observa una mayor disminución en aquellos que contenían mayor masa de macrófita. A las 48 horas, las concentraciones de Cd en los acuarios con diferentes masas, tanto para la concentración inicial de $2,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$ como para $6,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$, fueron estadísticamente diferentes (ANOVA, $p < 0,05$). Aplicando el test de Duncan con un nivel de confianza del 95 % se determinó que existe diferencia significativa entre los acuarios con diferentes masas de macrófitas, nuevamente determinándose dos grupos homogéneos uno formado por los acuarios con 25 y 50 g y otro por los acuarios con 100g y 200 g.

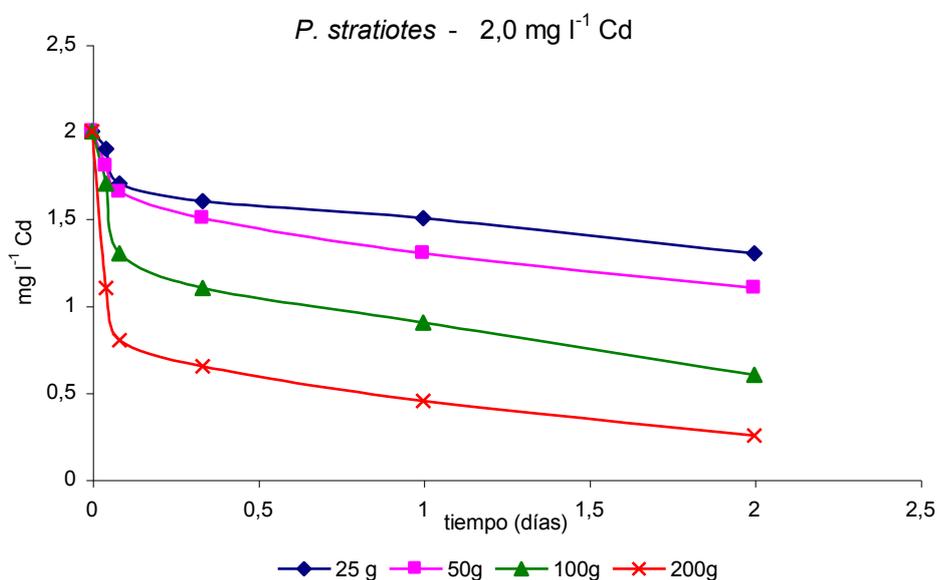


Figura 4.4.a.: Concentración de Cd en agua en los acuarios conteniendo las distintas masas de *P. stratiotes* en función del tiempo. Concentración inicial $2,0 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cd}$.

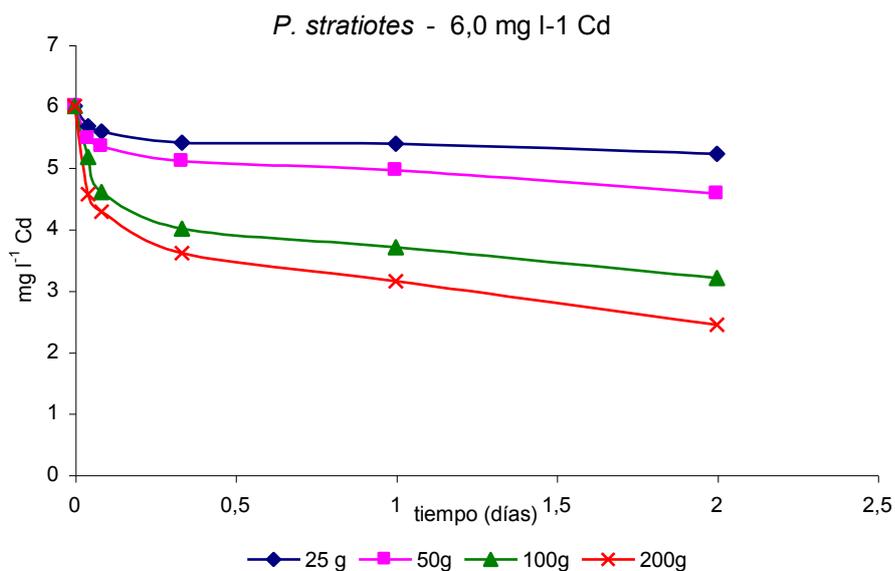


Figura 4.4.b.: Concentración de Cd en agua en los acuarios conteniendo las distintas masas de *P. stratiotes* en función del tiempo. Concentración inicial 6,0 mg l⁻¹ Cd.

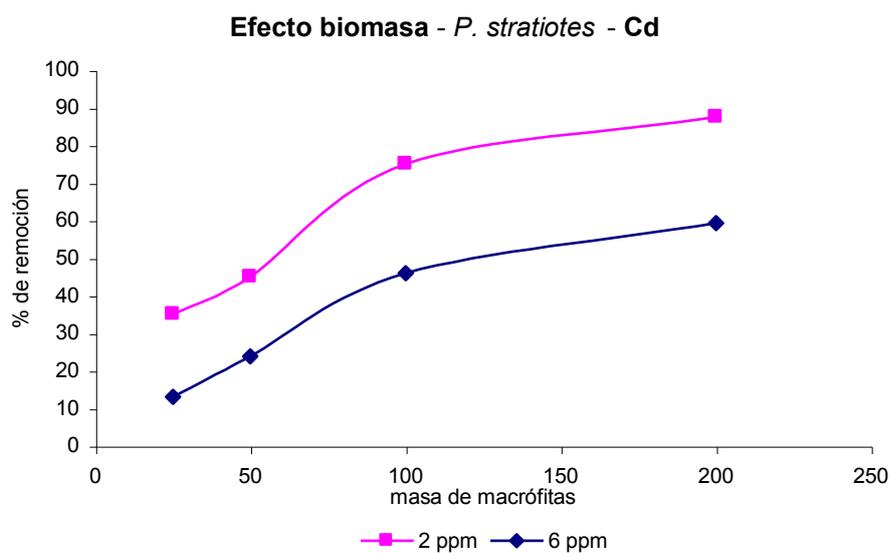


Figura 4.4.c.: Porcentajes de remoción de Cd en los distintos acuarios con diferentes masas de *P. stratiotes* a las dos concentraciones estudiadas.

La Figura 4.4.c. muestra los porcentajes de remoción de Cd a las 48 horas en los diferentes acuarios a las dos concentraciones estudiadas. Existen diferencias significativas en la remoción de Cd de aguas, tanto entre los acuarios con diferentes masas de macrófitas,

como para las dos concentraciones estudiadas (ANOVA, dos factores: concentración inicial de Cd y masa de macrófitas, $p < 0,05$). Al igual que en la experiencia con Cr, la interacción entre los factores es estadísticamente significativa. La prueba de intervalos múltiples de Duncan, con un nivel de confianza del 95 %, interacciones significativas y para todas las comparaciones posibles, indicó en todos los casos que los porcentajes de remoción en todos los acuarios son significativamente diferentes.

4.3. DIFERENCIAS ENTRE LAS DOS MACRÓFITAS UTILIZADAS

Las Figuras 4.3.a. a 4.3.b. muestran los porcentajes de remoción del metal en función de las diferentes masas utilizadas, para *S. herzogii* y *P. stratiotes*. En todos los casos *S. herzogii* presentó tasas de remoción significativamente mayores que *P. stratiotes* (Anova, 2 factores: masa y especie, $p < 0,05$), siendo esta diferencia más notoria a mayores concentraciones de metal utilizadas.

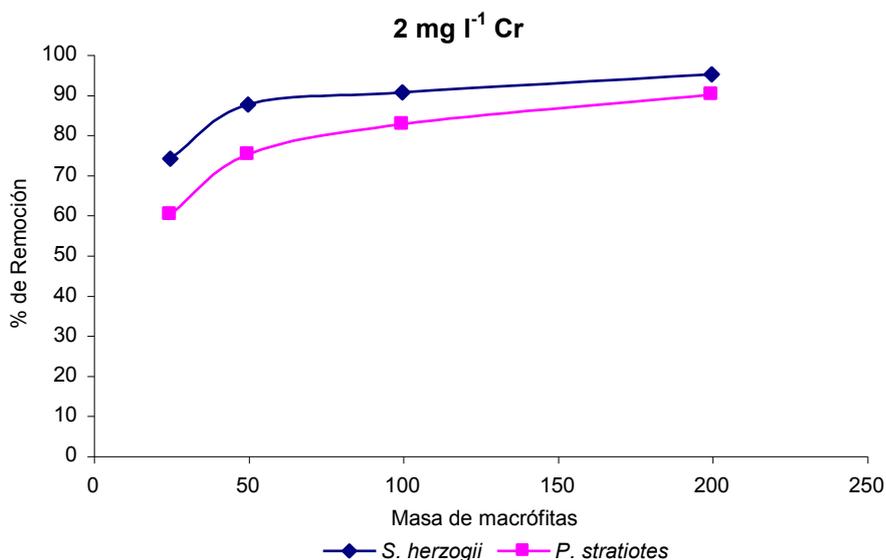


Figura 4.3.a.: Porcentajes de remoción de Cr en función de las distintas masas utilizadas y para las dos macrófitas. Concentración inicial 2 mg l⁻¹ Cr.

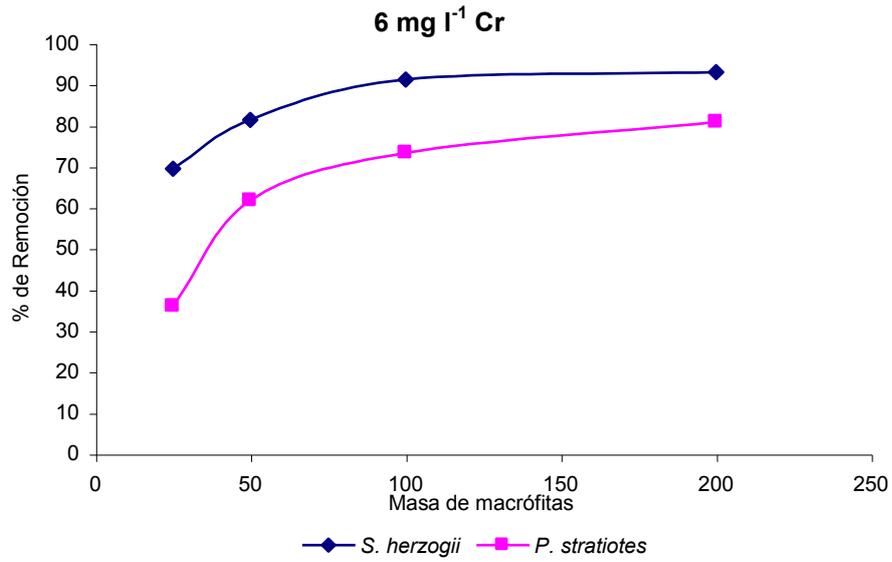


Figura 4.3.b.: Porcentajes de remoción de Cr en función de las distintas masas utilizadas y para las dos macrófitas. Concentración inicial 6 mg l⁻¹ Cr.

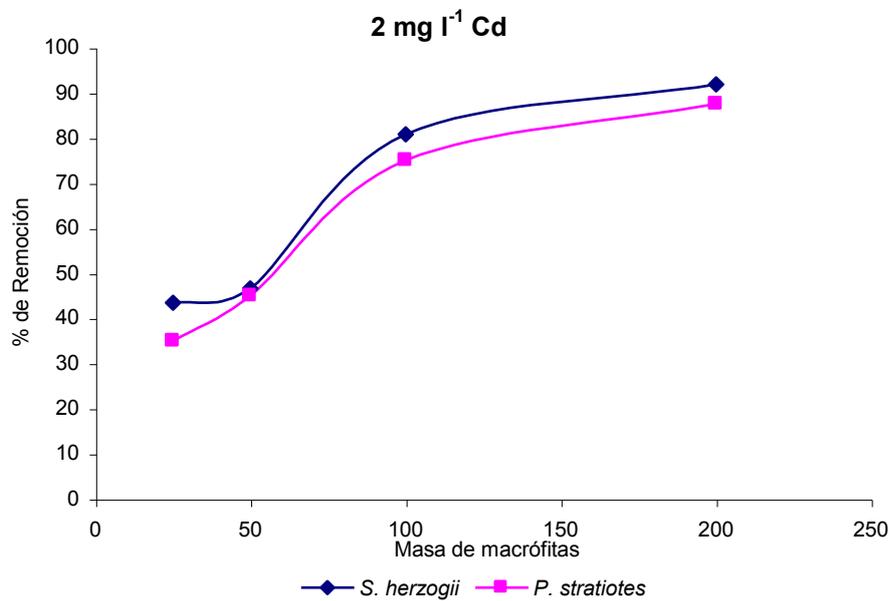


Figura 4.3.c.: Porcentajes de remoción de Cd en función de las distintas masas utilizadas y para las dos macrófitas. Concentración inicial 2 mg l⁻¹ Cd.

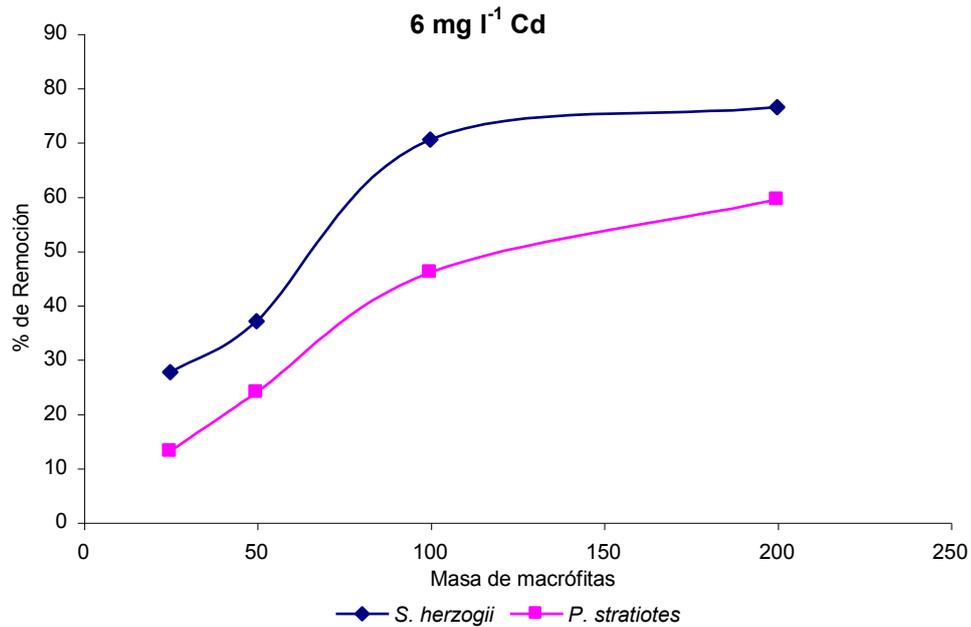


Figura 4.3.d.: Porcentajes de remoción de Cd en función de las distintas masas utilizadas y para las dos macrófitas. Concentración inicial 6 mg l⁻¹ Cd.

4.4. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones y las diferentes especies, que muestran que en la mayoría de los casos no es significativa la diferencia de remoción si se utiliza 100 ó 200 g de macrófitas y teniendo en cuenta que al utilizar 100 g de macrófita se obtiene una cobertura aproximadamente del 85 % de la superficie de los acuarios utilizados, condiciones similares a las encontradas en sistemas naturales, se concluye que la masa óptima a utilizar en el trabajo experimental en las condiciones propuestas es de 100 g.

5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOACUMULACIÓN DE *P.*

***stratiotes* y *S. herzogii* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Cr Y Cd.**

5.1. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

Para estudiar la bioacumulación de *P. stratiotes* y *S. herzogii* expuestas a distintas concentraciones de Cr (III) y Cd, se realizaron 2 experiencias en las que se utilizaron acuarios conteniendo 100 g de macrófitas húmedas y 7 l de agua del mismo lugar físico donde se recolectaron las plantas. Las características fisicoquímicas del agua se presentan en el Anexo I.

5.1.1. Experiencia 5.1.

Se determinó la capacidad de bioacumulación de Cr (III) de *P. stratiotes* y *S. herzogii*. Se adicionó Cr(III) (como $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) en todos los acuarios simultáneamente. Las concentraciones de Cr estudiadas fueron 1, 2, 4 y 6 mg l^{-1} . Se tomaron muestras de agua a 0, 30 minutos; 1,2 y 8 horas y 1, 5, 10, 20 y 31 días para determinar concentraciones de Cr en agua. Al final de la experiencia las plantas se lavaron, separaron en parte aérea y sumergida y se secaron. Se determinó la concentración de Cr en tejido.

5.1.2. Experiencia 5.2.

Se determinó la capacidad de bioacumulación de Cd de *P. stratiotes* y *S. herzogii*. Simultáneamente y en todos los acuarios se adicionó Cd (como $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$). Las concentraciones de Cd estudiadas fueron 1, 2, 4 y 6 mg l^{-1} . Para determinar la concentración de Cd en agua se tomaron muestras a 0, 30 minutos; 1,2 y 8 horas y 1, 5, 10, 20 y 31 días. Al final de la experiencia las plantas se lavaron, separaron en parte aérea y sumergida y se secaron. Se determinó la concentración de Cd en tejido.

5.1.3. Diseño de las experiencias

Los acuarios se colocaron en invernáculo con fotoperíodo natural, las experiencias se llevaron a cabo durante los meses setiembre a noviembre. Durante el período experimental la temperatura ambiente promedio fue de 22°C (24°C máxima y 14°C mínima). El pH se mantuvo en los acuarios con Cr en un rango ligeramente ácido (6,3-6,8) y en los acuarios con Cd alrededor de 7,0. Se dispusieron acuarios control químico sin plantas y además acuarios control biológico, colocando cada macrófita en agua de laguna sin adición de metal. Se calculó la tasa de crecimiento relativo promedio. Se presentan valores medios.

5.2. RESULTADOS Y DISCUSION

5.2.1. Experiencia 5.1.

Las Fig.5.1.a. y 5.1.b. muestran los porcentajes de remoción de Cr en agua en los acuarios conteniendo *P. stratiotes* y *S. herzogii*, respectivamente para las distintas concentraciones iniciales estudiadas. La disminución de Cr en agua se produce fundamentalmente durante las primeras 24 horas, siendo las velocidades de remoción directamente proporcionales a las concentraciones iniciales. Se determinó que después de 31 días *S. herzogii* y *P. stratiotes* eliminaron eficientemente Cr de agua a las concentraciones estudiadas. No se observaron disminuciones significativas en las concentraciones de Cr en los acuarios sin presencia de macrófitas a todas las concentraciones estudiadas. En todos los casos, las concentraciones finales de Cr en agua en los acuarios con macrófitas fueron significativamente más bajas que en los acuarios control químico (Test de Dunett, $\alpha= 0,05$). Por lo tanto, es posible concluir que la disminución en la concentración de Cr se debe principalmente a la bioacumulación de las plantas.

Para ambas especies, tanto la concentración del metal como el tiempo tienen un efecto estadísticamente significativo en la sorción de Cr a un nivel de confianza del 95% (Anova, dos factores (tiempo y concentración inicial, $p < 0,05$). A las 24 hs de experiencia *P. stratiotes* removió entre el 58 y 80 % de Cr adicionado y *S. herzogii* entre el 70 y 83 %. Sin embargo las concentraciones finales de Cr en todos los acuarios no presentaron diferencias significativas (test t de a pares, $p < 0,01$), alcanzando *P. stratiotes* una remoción del 84-91% y *S. herzogii* del 90-93%. Esto indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en la utilización de *P. stratiotes* o *S. herzogii* en la remoción de Cr a todas las concentraciones.

En todos los casos, la concentración final de Cr en tejidos vegetales fue de 50-100 veces mayor que la concentración inicial. El Cr se acumula fundamentalmente en raíces. Tanto la concentración en raíces como en hojas de las macrófitas estudiados presentaron una correlación lineal significativa con la concentración de Cr en solución (Tabla 5.1.). Estos resultados coinciden con los de otros autores que estudiaron otras especies flotantes (Chandra y Garg, 1992, Maine et al. 2004, Soltan y Rashed, 2003).

La concentración de Cr influye en las tasas de crecimiento de *P. stratiotes* y *S. herzogii*, presentando en ambos casos una significativa correlación lineal negativa (Tabla 5.1.). De cualquier modo, no se observaron tasas de crecimiento negativas en ningún caso.

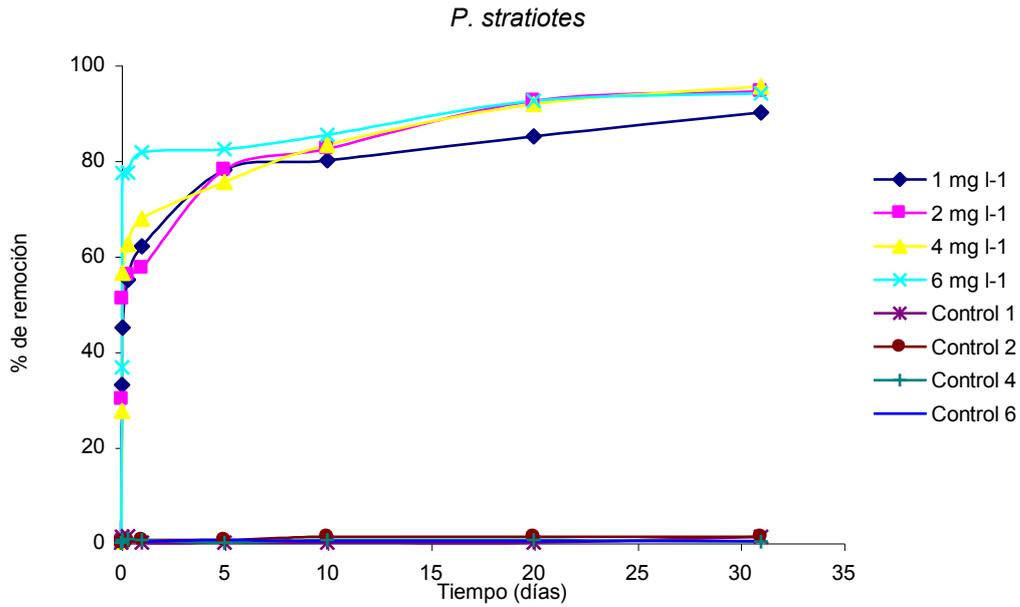


Figura 5.1.a.: Porcentajes de remoción de Cr (III) en los acuarios conteniendo *P. stratiotes* a todas las concentraciones estudiadas. (Control indica control químico)

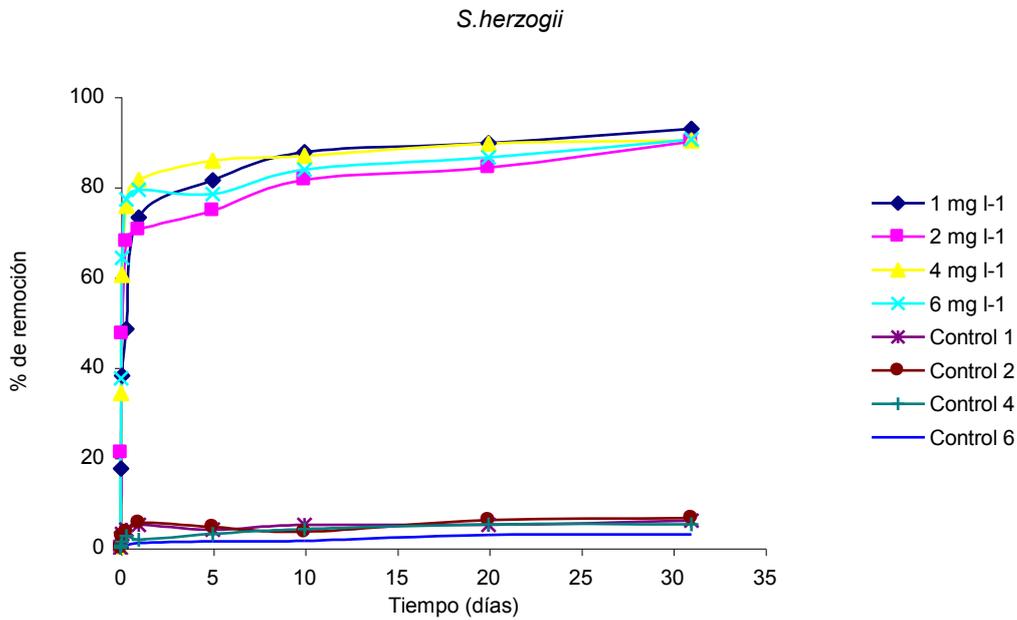


Figura 5.1.b.: Porcentajes de remoción de Cr (III) en los acuarios conteniendo *S. herzogii* a todas las concentraciones estudiadas. (Control indica el control químico)

Tabla 5.1.: Concentración de Cr en tejido (mg g^{-1} Cr) y tasas de crecimiento relativo promedio (R), para *S. herzogii* y *P. stratiotes*. Coeficiente de correlación lineal (r) entre las tasas de crecimiento relativo promedio (R) y la concentración inicial en agua y entre las concentraciones finales de Cd en parte aérea y raíces de las plantas y la concentración inicial en agua.

Reactor	<i>P. stratiotes</i>			<i>S. herzogii</i>		
	Raíces	Parte Aérea	R	Raíces	Parte Aérea	R
Control	$0,018 \pm 0,002$	$0,011 \pm 0,002$	0,017	$0,051 \pm 0,012$	$0,016 \pm 0,002$	0,017
Final 1 mg l^{-1}	$0,678 \pm 0,05$	$0,079 \pm 0,02$	0,016	$0,794 \pm 0,015$	$0,093 \pm 0,011$	0,017
Final 2 mg l^{-1}	$1,55 \pm 0,11$	$0,123 \pm 0,02$	0,012	$1,75 \pm 0,21$	$0,221 \pm 0,017$	0,012
Final 4 mg l^{-1}	$2,70 \pm 0,15$	$0,177 \pm 0,02$	0,007	$3,39 \pm 0,18$	$0,253 \pm 0,027$	0,012
Final 6 mg l^{-1}	$3,74 \pm 0,22$	$0,269 \pm 0,02$	0,003	$6,20 \pm 0,29$	$0,448 \pm 0,019$	0,009
Coef. de Correlación lineal (r)	0,9961 ($p < 0,001$)	0,9902 ($p < 0,005$)	-0,9729 ($p < 0,005$)	0,9834 ($p < 0,001$)	0,9193 ($p < 0,005$)	-0,9428 ($p < 0,05$)

5.2.2. Experiencia 5.2.

En las Figs. 5.2.a. y 5.2.b. se observan los porcentajes de remoción de Cd en agua en los acuarios conteniendo *P. stratiotes* y *S. herzogii*, respectivamente para las distintas concentraciones iniciales utilizadas lo largo de la experiencia. La disminución de Cd en agua se produce fundamentalmente durante las primeras 24 horas y las velocidades de remoción son directamente proporcionales a las concentraciones iniciales. A los 31 días *S. herzogii* y *P. stratiotes* eliminaron eficientemente el Cd de agua a las concentraciones estudiadas. Las concentraciones finales de Cd en agua en los acuarios con macrófitas fueron, en todos los casos, significativamente más bajas que en los acuarios sin presencia

de macrófitas (Test de Dunett, $\alpha= 0,05$). Por lo que se puede concluir que la disminución en la concentración de Cd se debe principalmente a la sorción de las plantas.

Para ambas especies, tanto la concentración del metal como el tiempo tienen un efecto estadísticamente significativo en la sorción de Cd a un nivel de confianza del 95% (Anova, dos factores (tiempo y concentración inicial, $p<0,05$). A las 24 hs de experiencia *P. stratiotes* removió entre el 49 y 74 % de Cd adicionado y *S. herzogii* entre el 45 y 59%. A los 31 días de experiencia, *P. stratiotes* removió 85-88% y *S. herzogii* removió el 90-94%, no existiendo diferencia estadísticamente significativa en la utilización de *P. stratiotes* o *S. herzogii* en la eliminación de Cd en agua a todas las concentraciones estudiadas (test t de a pares, $p<0.01$).

La concentración final de Cd en tejidos vegetales fue, en todos los casos, varias veces mayor que la concentración inicial (Tabla 5.2.). El Cd se acumuló fundamentalmente en raíces. Estos resultados coinciden con los de otros autores que estudiaron otras especies flotantes (Chandra y Garg, 1992, Satkyala y Kaiser, 1997, Maine et al. 2001, Soltan y Rashed, 2003).

Tanto la concentración en raíces como en hojas de las macrófitas estudiadas presentaron una correlación lineal significativa con la concentración de Cd en solución (Tabla 5.2.).

La concentración de Cd influye en gran medida en las tasas de crecimiento de *P. stratiotes* y *S. herzogii*, presentando en ambos casos una significativa correlación lineal negativa (Tabla 5.2.). Para *S. herzogii* no se observaron tasas de crecimiento negativas en ningún caso, mientras *P. stratiotes* presentó tasas negativas para concentraciones iniciales de 4 y 6 mg l⁻¹.

P. stratiotes

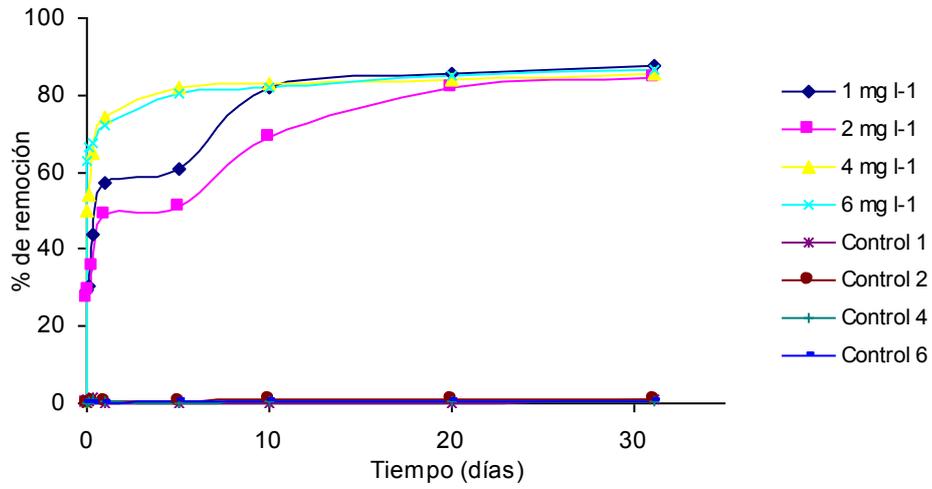


Figura. 5.2.a.: Porcentajes de remoción de Cd en los acuarios conteniendo *P. stratiotes* a todas las concentraciones estudiadas. (Control indica el control químico)

S. herzogii

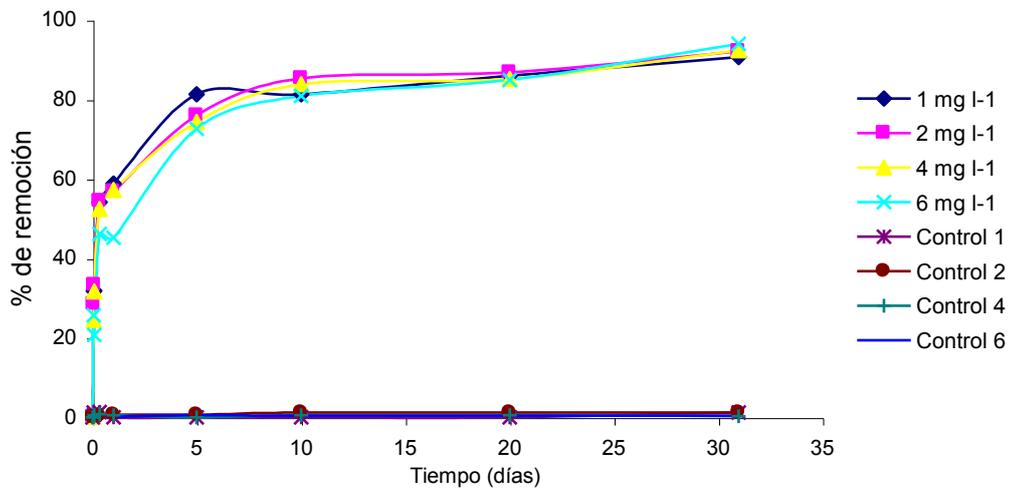


Figura 5.2.b.: Porcentajes de remoción de Cd en los acuarios conteniendo *S. herzogii* a todas las concentraciones estudiadas. (Control indica el control químico).

Tabla 5.2.: Concentración de Cd en tejido (mg g^{-1} Cd) y tasas de crecimiento relativo promedio (R), para *S. herzogii* y *P. stratiotes*. Coeficiente de correlación lineal (r) entre las tasas de crecimiento relativo promedio (R) y la concentración inicial en agua y entre las concentraciones finales de Cd en parte aérea y raíces de las plantas y la concentración inicial en agua.

Reactor	<i>P. stratiotes</i>			<i>S. herzogii</i>		
	Raíces	Parte Aérea	R	Raíces	Parte Aérea	R
Control	$0,024 \pm 0,002$	$0,011 \pm 0,002$	0,016	$0,020 \pm 0,009$	$0,010 \pm 0,003$	0,013
Final 1 mg l^{-1}	$2,061 \pm 0,181$	$0,223 \pm 0,019$	0,016	$2,230 \pm 0,022$	$0,537 \pm 0,015$	0,012
Final 2 mg l^{-1}	$2,472 \pm 0,123$	$0,382 \pm 0,016$	0,015	$3,916 \pm 0,191$	$0,762 \pm 0,017$	0,008
Final 4 mg l^{-1}	$3,750 \pm 0,261$	$0,440 \pm 0,023$	- 0,001	$6,632 \pm 0,234$	$2,555 \pm 0,102$	0,004
Final 6 mg l^{-1}	$4,363 \pm 0,321$	$0,511 \pm 0,034$	- 0,003	$8,770 \pm 0,295$	$5,361 \pm 0,115$	0,001
Coef. de Correlación (r)	0,9890 ($p < 0,05$)	0,9270 ($p < 0,05$)	-0,93870 ($p < 0,1$)	0,9911 ($p < 0,05$)	0,9722 ($p < 0,05$)	-0,9891 ($p < 0,05$)

5.3. CONCLUSIONES

- *S. herzogii* y *P. stratiotes* pueden reducir la concentración de Cr y Cd en agua a muy bajos niveles, cuando las concentraciones iniciales son de 1-6 mg l^{-1} , presentando la primera de las especies una mejor tolerancia a la exposición al Cd.
- Puede proponerse que ambas macrófitas son eficientes en la sorción de Cr y Cd, por lo que son potencialmente utilizables en sistemas de eliminación de estos metales de agua.

- En ambientes naturales, podrían utilizarse las raíces de *S. herzogii* y *P. stratiotes* como bioindicadores de contaminación debido a su gran capacidad para concentrar Cr y Cd.

6. CAPACIDAD DE BIOACUMULACIÓN DE Cr(VI) DE *P. stratiotes* y *S. herzogii*

6.1. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

Se utilizaron plantas maduras de ambas especies, previamente aclimatadas. Se dispusieron acuarios conteniendo 7 litros de agua potable, previa eliminación de cloro. En dos acuarios y sus réplicas se colocaron 100 g de *S. herzogii*, en otros dos 100 g de *P. stratiotes*, los dos restantes se utilizaron como control químico. A todos los acuarios se le agregó Cr(VI) como $K_2Cr_2O_7$, para obtener concentraciones iniciales de 2 y 6 mg l⁻¹. El pH se ajustó a 7,2 de manera tal que el Cr se encontrara como $CrO_4^{=}$, y no presentó variaciones importantes durante la experiencia. Se controló el nivel de agua, adicionando agua destilada para reponer la pérdida por evaporación y evapotranspiración. Se tomaron muestras de agua inicialmente, a las 2 y 8 hs, 1, 2, 3, 7, 9, 13, 16 y 21 días. En los acuarios conteniendo *P. stratiotes* la experiencia finalizó el día 11. Se tomaron muestras de macrófitas al iniciar y finalizar la experiencia y se las separó en parte aérea y sumergida.

6.2. RESULTADOS Y DISCUSION

Las Figuras 6.2.a. y 6.2.b. muestran la concentración de Cr en agua en los reactores conteniendo *P. stratiotes* y *S. herzogii*, respectivamente para las distintas concentraciones iniciales estudiadas a lo largo de la experiencia.

Aplicando el test de Dunett a las concentraciones de Cr en agua obtenidas en los acuarios con las distintos macrófitas y los acuarios control sin macrófitas para 2 y 6 mg l⁻¹, se concluye que existe diferencia significativa ($\alpha = 0,05$) con los acuarios control químico, pudiendo proponerse que la disminución de Cr, a las dos concentraciones estudiadas, se debe fundamentalmente a la sorción de Cr por los vegetales. Para ambas especies, tanto la concentración del metal como el tiempo tienen un efecto

estadísticamente significativo en la sorción Cr a un nivel de confianza del 95% (Anova, dos factores, $p < 0,05$).

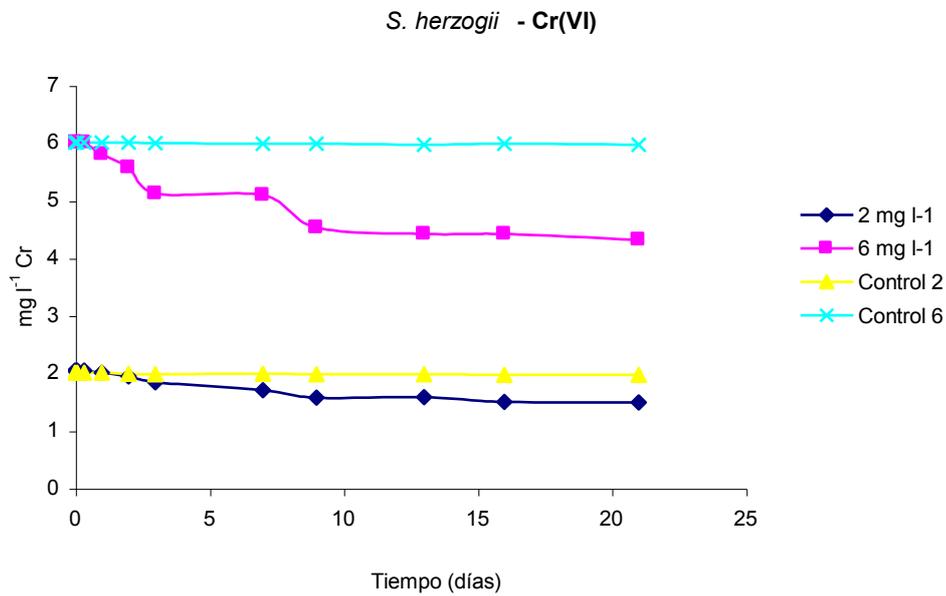


Figura 6.2.a.: Concentración de Cr (VI) en agua en los acuarios conteniendo *S. herzogii* en función del tiempo.

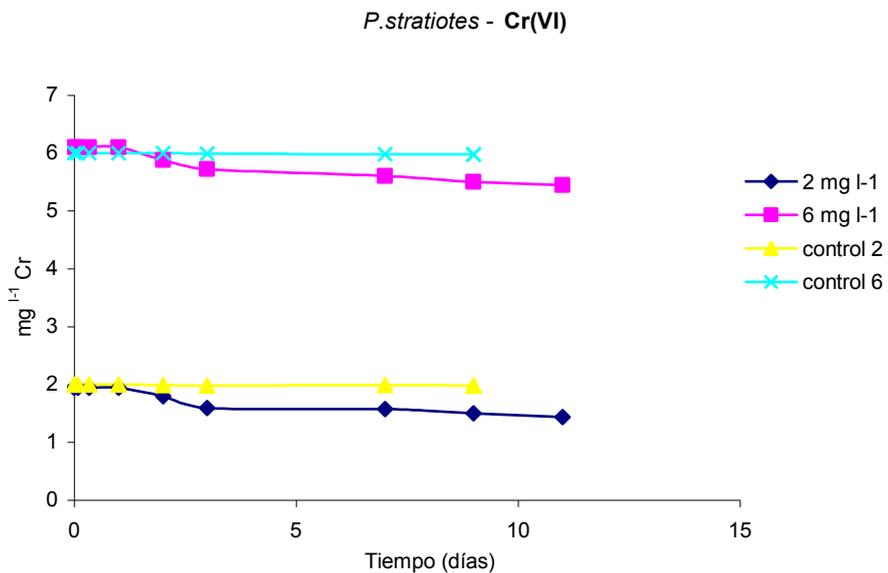


Figura 6.2.b.: Concentración de Cr (VI) en agua en los acuarios conteniendo *P. stratiotes* en función del tiempo.

Las Figuras 6.2.c. y 6.2.d. muestran los porcentajes de remoción de Cr(VI) de aguas para *S. herzogii* y *P. stratiotes* respectivamente.

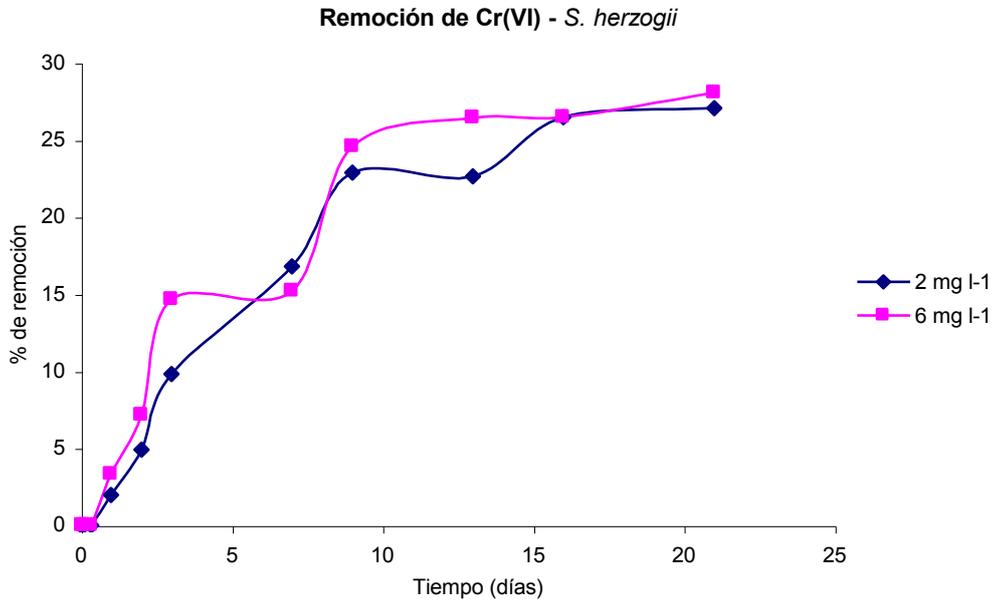


Figura 6.2.c.: Porcentajes de remoción de Cr(VI) en función del tiempo para la especie *S. herzogii*.

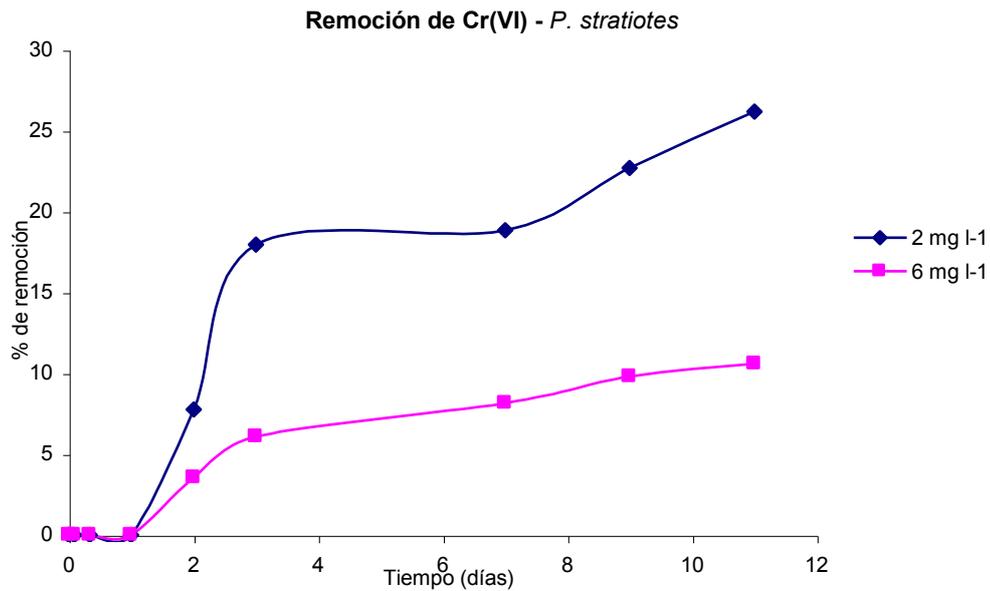


Figura 6.2.d.: Porcentajes de remoción de Cr(VI) en función del tiempo para la especie *P. stratiotes*.

No existió diferencia significativa en los porcentajes de remoción de Cr (VI) a las dos concentraciones estudiadas para la especie *S. herzogii* (ANOVA, $p < 0,05$), en cambio si la hubo para la especie *P. stratiotes*.

Los porcentajes de remoción de Cr(VI) del agua fueron en todos los casos significativamente menores a los obtenidos para Cr(III). Las especies, y en especial *P. stratiotes*, registraron menor tolerancia al agregado de Cr(VI), demostrado en su tasa de crecimiento. La experiencia con *P. stratiotes* a las dos concentraciones estudiadas, se finalizó el día 11 ya que todo el tejido vegetal, tanto de parte aérea como de raíces, se encontraba muy deteriorado. La experiencia con *S. herzogii*, prosiguió hasta el día 21, pero finalizó con las mismas consecuencias. La Tabla 6.2.1. muestra los % de remoción a los 11 días de experiencia para comparar las dos especies, y además a los 21 días para *S. herzogii*.

Tabla 6.2.1.: Porcentajes de remoción de Cr(VI) a los 11 y 21 días de experiencia de los acuarios conteniendo 2 y 6 mg l⁻¹ de Cr (VI) para las macrófitas estudiadas.

Concentración inicial de Cr(VI) en agua	Especie	% de remoción (11 días)	% de remoción (21 días)
2 mg l ⁻¹	<i>S. herzogii</i>	22	27
6 mg l ⁻¹		25	28
2 mg l ⁻¹	<i>P. stratiotes</i>	26	--
6 mg l ⁻¹		10	--

En la Tabla 6.2.2. se encuentran resumidos los valores correspondientes a la concentración final de Cr en las dos especies utilizadas.

Tabla 6.2.2. : Concentraciones iniciales y finales de Cr en tejido vegetal.

*Luego de 11 días de exposición, ** luego de 21 días de exposición

Especie	Conc. Inicial (mg g ⁻¹ Cr)	Conc. Final (mg g ⁻¹ Cr) 2 mg l ⁻¹	Conc. Final (mg g ⁻¹ Cr) 6 mg l ⁻¹
<i>S. herzogii</i> parte aérea	0.016± 0.006	0,332± 0,021**	0,880± 0,023**
<i>S. herzogii</i> raíz	0.051 ± 0.010	1,09± 0,19**	2,57± 0,26**
<i>P. stratiotes</i> parte aérea	0.011± 0.002	0,249± 0,018*	0,527± 0,022*
<i>P. stratiotes</i> raíz	0.018± 0.002	0,93± 0,15*	1.86± 0,19*

En ambas especies vegetales hubo un incremento significativo de la concentración del metal respecto a la concentración inicial, siendo la concentración en raíces significativamente superior en todos los casos que la concentración en parte aérea. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de Cr en tejido vegetal tanto en parte aérea como en raíces entre las dos especies estudiadas para la concentración inicial de 2 mg l⁻¹ de Cr(VI), siendo esta diferencia significativa para la concentración inicial de 6 mg l⁻¹ (ANOVA, p< 0,05).

En la Tabla 6.2.3. se presentan las tasas de crecimiento relativo promedio para las dos especies y las dos concentraciones estudiadas. En todos casos se obtuvieron tasas negativas, las que fueron mayores para *P. stratiotes*, confirmando la evidencia visual mencionada anteriormente.

Tabla 6.2.3: Tasas de crecimiento relativas promedio

Especie	R (2 mg l ⁻¹)	R (6 mg l ⁻¹)
<i>S. herzogii</i>	-0,005	-0,008
<i>P. stratiotes</i>	-0,033	-0,038

6.3. COMPARACIÓN ENTRE LA BIOACUMULACION DE Cr(III) Y Cr(VI)

A fin de establecer diferencias entre la sorción y translocación de Cr(VI) y Cr(III) por las macrófitas flotantes *S. herzogii* y *P. stratiotes*, se compararon los resultados obtenidos en las experiencias anteriores.

Los porcentajes de remoción de Cr(VI) del agua fueron en todos los casos significativamente menores si los comparamos con los obtenidos para Cr(III) (ANOVA, $p < 0,05$). La cinética de sorción también fue diferente. Si comparamos los porcentajes de remoción de Cr (III) y Cr(VI) a las 24 hs de experimento para ambas especies, se observa que la cinética de sorción de Cr(III) es más rápida que la de Cr(VI) (Tabla 6.3.1.).

Las especies, y en especial *P. stratiotes*, demostraron menor tolerancia al agregado de Cr(VI). Es de destacar los significativamente diferentes porcentajes de remoción (a los 11 días de experimento) que presentaron las dos especies en los acuarios con agregado de 6 mg l⁻¹ de Cr (VI): 25 % para *S. herzogii* y 10 % para *P. stratiotes* (Tabla 6.3.1.). De acuerdo a estos resultados y teniendo en cuenta las tasas de crecimiento, puede demostrarse que *P. stratiotes* es menos tolerante a la presencia de Cr(VI) en agua y en consecuencia menos eficiente en su remoción. Para los acuarios con agregado de Cr(III) a las dos concentraciones iniciales, las especies no presentaron síntomas de fitotoxicidad visibles

Tabla 6.3.1.: Porcentajes de remoción de Cr(VI) y Cr(III) en agua en los acuarios conteniendo *S. herzogii* y *P. stratiotes*.

Concentración inicial de Cr en agua	Especie	Cr (VI)			Cr (III)		
		% de remoción			% de remoción		
		24 horas	11 días	21 días	24 horas	11 días	21 días
2 mg l ⁻¹	<i>S. herzogii</i>	2	22	27	70	82	90
6 mg l ⁻¹		3	25	28	79	84	89
2 mg l ⁻¹	<i>P. stratiotes</i>	0	26	--	57	88	93
6 mg l ⁻¹		0	10	--	82	87	93

En la Tabla 6.3.2. se encuentran resumidos los valores de concentración de Cr en tejidos de las dos especies utilizadas. A pesar de los diferentes tiempos de exposición, esta comparación es válida ya que para las experiencias con Cr(III), se determinó que la mayor sorción se produce en las primeras horas de contacto con la solución adicionada, las diferencias en las concentraciones a los 11 o 21 días de contacto no cambiarán las conclusiones.

Tabla 6.3.2.: Concentraciones iniciales y finales de Cr en tejido vegetal. Las concentraciones están expresadas en mg g⁻¹ Cr de peso seco. Cada valor es la media de cinco réplicas ± D.S.

* Luego de 11 días de exposición, ** luego de 21 días de exposición, *** todos los resultados de las experiencias con Cr(III) fueron luego de 31 días de exposición.

Especie	Conc. Inicial (mg g ⁻¹ Cr)	2 mg l ⁻¹		6 mg l ⁻¹	
		Cr(VI)	Cr(III)***	Cr VI)	Cr(III)***
<i>S. herzogii</i> parte aérea	0.016± 0.006	0,332± 0,021**	0,221± 0,017	0,880± 0,023**	0,448± 0,019
<i>S. herzogii</i> raíz	0.051 ± 0.010	1,09± 0,19**	1,75± 0,21	2,57± 0,26**	6,20± 0,29
<i>P. stratiotes</i> parte aérea	0.011± 0.002	0,249± 0,018*	0,123± 0,021	0,527± 0,022*	0,269± 0,026
<i>P. stratiotes</i> raíz	0.018± 0.002	0,93± 0,15*	1,55± 0,11	1.86± 0,19*	3,74± 0,22

En ambas especies vegetales hubo un incremento importante de la concentración del metal respecto a la concentración inicial, siendo la concentración en raíces superior en todos los casos que la concentración en parte aérea. En todos los acuarios, para las dos especies y las dos concentraciones estudiadas, la concentración de Cr en raíces en los acuarios con agregado de Cr(III) fue significativamente superior a la de los acuarios con agregado de Cr(VI)(ANOVA, p< 0,05).

En todos los casos la concentración de Cr en parte aérea de ambas especies fue significativamente menor en las correspondientes a los acuarios con agregado de Cr(III).

Si comparamos las especies de macrófitas utilizadas, podemos decir que no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de Cr en tejido tanto en parte aérea como en raíces entre las dos especies estudiadas para la concentración inicial de 2 mg l⁻¹ de Cr(VI), siendo esta diferencia significativa para la concentración inicial de 6 mg l⁻¹ de Cr(VI) y 2 y 6 mg l⁻¹ de Cr(III)(ANOVA, p< 0,05), siendo siempre superiores para *S. herzogii*.

En la Tabla 6.3.3. se presentan las tasas de crecimiento relativo promedio para las dos especies vegetales, las dos formas de Cr agregadas y las dos concentraciones estudiadas. Para Cr(VI), en todos casos se obtuvieron tasas negativas, las que fueron más negativas para *P. stratiotes*, lo que no hace más que confirmar la evidencia visual mencionada anteriormente. Las macrófitas expuestas a Cr(III), presentaron en todos los casos tasas positivas.

Tabla 6.3.3.: Tasas de crecimiento relativas promedio R (g peso seco g⁻¹ peso seco día⁻¹)

Especie	Control	Cr (VI)		Cr (III)	
		2 mg l ⁻¹	6 mg l ⁻¹	2 mg l ⁻¹	6 mg l ⁻¹
<i>S. herzogii</i>	0,017	-0,005	-0,008	0,012	0,009
<i>P. stratiotes</i>	0,016	-0,033	-0,038	0,012	0,003

A pesar de que se halló una mayor absorción de Cr(III) que de Cr(VI) en raíces de ambas macrófitas, más Cr fue translocado hacia las partes aéreas cuando se suministró como Cr (VI). Similares resultados fueron encontrados por Skeffington et al. (1976) en estudios realizados en cebada y por Mehrad y Peterson (1979) en plantas de cosecha. La menor translocación de Cr(III), que presentan la mayoría de las plantas, podría deberse a la acumulación preferencial de este elemento en las paredes celulares y en las vacuolas de las raíces. Así entonces, si el Cr se suministra en forma de Cr(VI) y la concentración suministrada supera la capacidad reductora de las células, la capacidad de intercambio iónico de las paredes celulares de las raíces y su capacidad de almacenar el Cr en las

vacuolas, el Cr es translocado hacia las partes superiores de las plantas. No está claro actualmente bajo que forma química se transporta el Cr hacia las partes aéreas. Tiffin (1972) concluye, de sus estudios con extractos de xilema, que el Cr es transportado como complejo aniónico. Lyon, et al (1969a) propusieron que el Cr en una planta acumuladora (*Leptospermum scoparium*), se halla como complejo de oxalato de Cr(III), pero este complejo no está presente en la savia del xilema (Lyon, et al, (1969b). Parece ser que la pequeña fracción del Cr(VI) suministrado a las raíces que no es retenido en ellas es transportado de forma inalterada a través del xilema y en las hojas es convertida en diversos complejos aniónicos de bajo peso molecular del tipo del oxalato de Cr(III) (Bollard, 1983).

6.4. CONCLUSIONES

- No existió diferencia significativa en los porcentajes de remoción de Cr (VI) a las dos concentraciones estudiadas para la especie *S. herzogii*, en cambio si hubo diferencias entre las especies estudiadas. *S herzogii* fue eficiente en la sorción de Cr (VI), mientras que especie *P. stratiotes* sufrió síntomas de fitotoxicidad y posterior necrosis a las dos concentraciones estudiadas.
- La cinética de sorción de Cr (VI) fue mucho más lenta que la de Cr (III) en las dos macrófitas estudiadas.

- Cuando se suministró 6 mg l^{-1} de Cr en forma de Cr(III), la concentración de Cr en raíces fue significativamente superior en ambas especies que cuando se agregó en forma de Cr (VI).
- El Cr fue transportado hacia las partes aéreas en mayor proporción cuando se suministró en forma de Cr (VI).

7. DISTRIBUCION DE Cr y Cd EN *P. stratiotes* y *S. herzogii*.

7.1. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

Se evaluó la distribución de Cr (III) y Cd en partes aéreas y raíces de *S. herzogii* y *P. stratiotes* en función del tiempo.

Se utilizaron acuarios con 100 g de vegetal húmedo (*S. herzogii* o *P. stratiotes*) y 5 l de agua de laguna con el agregado de Cr y/o Cd de forma de lograr concentraciones de 1 mg l⁻¹. Las características fisicoquímicas del agua de laguna se presentan en el Anexo I.

Los acuarios se colocaron en invernáculo con fotoperíodo natural, las experiencias se llevaron a cabo en primavera. Durante el período experimental la temperatura ambiente promedio fue de 21°C (23°C máxima y 12°C mínima). El pH se mantuvo en los acuarios con Cr en un rango ligeramente ácido (6,3-6,8) y en los acuarios con Cd alrededor de 7,0. Todos los acuarios se dispusieron por triplicado. Se presentan valores medios.

En cada muestreo se colectó la totalidad de las macrófitas del reactor y una muestra de agua. Los muestreos se realizaron inicialmente, a los 30 minutos, a las 2, 8 y 24 hs y a los 2, 7, 14 y 31 días y se determinó la distribución del metal en agua, parte aérea y sumergida de las macrófitas estudiadas en función del tiempo.

7.2. RESULTADOS Y DISCUSION

Las Figuras 7.1.a. y 7.1.b. muestran los resultados de la experiencia con agregado de Cr (III). Se graficó el contenido de Cr, con el objeto de estimar el contenido total de metal en los tres compartimentos (agua – raíz – hoja). La acumulación de Cr se produjo fundamentalmente en las raíces de ambas macrófitas. La concentración de Cr en raíces aumentó en forma notoria durante las primeras 24 horas de contacto, concentrando en raíces más del 20 % y del 30 % del Cr agregado durante los primeros 30 minutos de

contacto y el 66 % y el 75 % del Cr agregado durante las primeras 24 horas, para *S. herzogii* y *P. stratiotes*, respectivamente. A los 31 días, el contenido de Cr en raíces fue el 80 % y el 86 % del Cr adicionado, respectivamente.

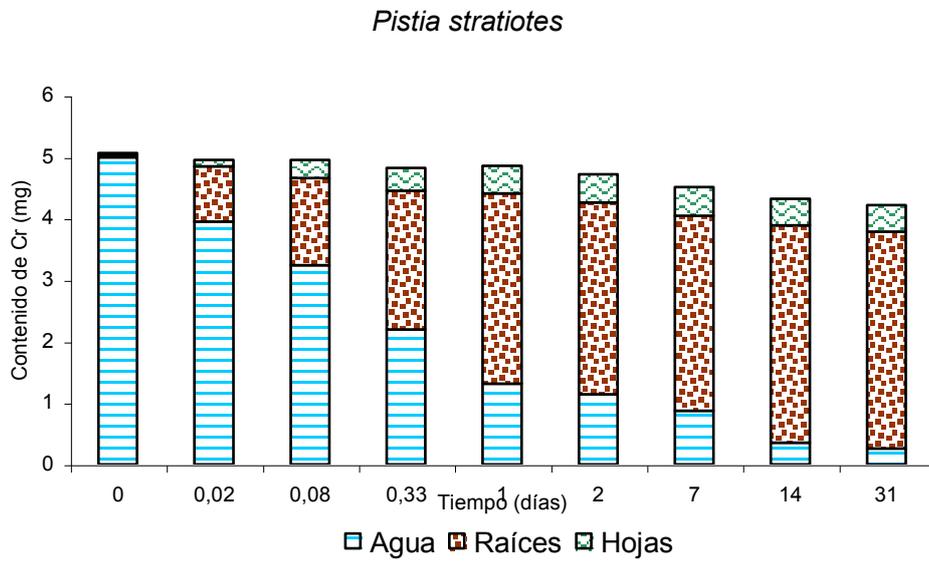


Figura 7.1.a. : Contenido de Cr en las distintas partes de la planta en función del tiempo

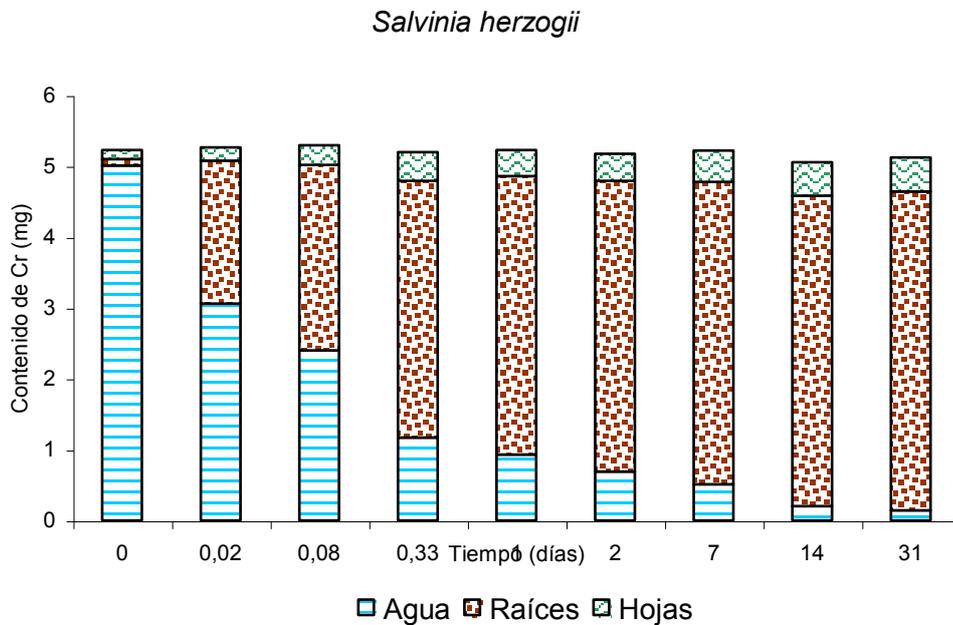


Figura 7.1.b.: Contenido de Cr en las distintas partes de la planta en función del tiempo.

El aumento del contenido de Cr en raíces es un proceso rápido y ocurre principalmente dentro de las primeras 24 horas. En el caso de *P. stratiotes* puede observarse que después de las primeras 24 horas hubo una disminución en el contenido total de Cr en el sistema, la que podría deberse a la precipitación química de compuestos de Cr sobre la superficie de las raíces inducida por los exudados de las raíces (el Cr de estos compuestos no fue determinado en el análisis de Cr en raíces, ya que las raíces se enjuagaron con agua destilada luego de ser colectadas del acuario). Un análisis por microscopía electrónica de barrido con obtención de micrografía, mostró formaciones esponjosas en varias partes de las raíces. Como veremos más adelante en el Capítulo 12, el análisis químico elemental por rayos X con sonda de electrones (EPMA) de esa zona, determinó que la composición elemental de estas formaciones corresponde a Al (4 %), Cl (4 %), K (17 %), Cr (45 %), Mn (9 %) y Fe (21 %). Estos resultados demuestran que no solo se produce la precipitación del Cr, sino también la de elementos contiguos a él en la tabla periódica (Mn y Fe) y por lo tanto con similares características químicas. La disminución de la masa total de metal en los últimos muestreos podría deberse a que estos precipitados habrían sido eliminados durante el lavado de las raíces previo a la digestión ácida de las mismas para la determinación de la concentración de Cr. Esta precipitación inducida no se observó en *S. herzogii*.

Respecto a las partes aéreas de ambas macrófitas, se observó un incremento en el contenido de Cr en las primeras 24 hs, siendo esta acumulación en parte aérea de ambas macrófitas aproximadamente el 9 % del Cr agregado y a partir de las 24 hs no se observaron diferencias significativas en función del tiempo (ANOVA , $p < 0,05$).

En las Figuras 7.2.a. y 7.2.b. se graficaron los resultados de la experiencia con agregado de Cd. Al igual que para Cr, la acumulación de Cd se produjo fundamentalmente

en las raíces de ambas plantas, fue un proceso rápido y ocurrió principalmente dentro de las primeras 24 hs.

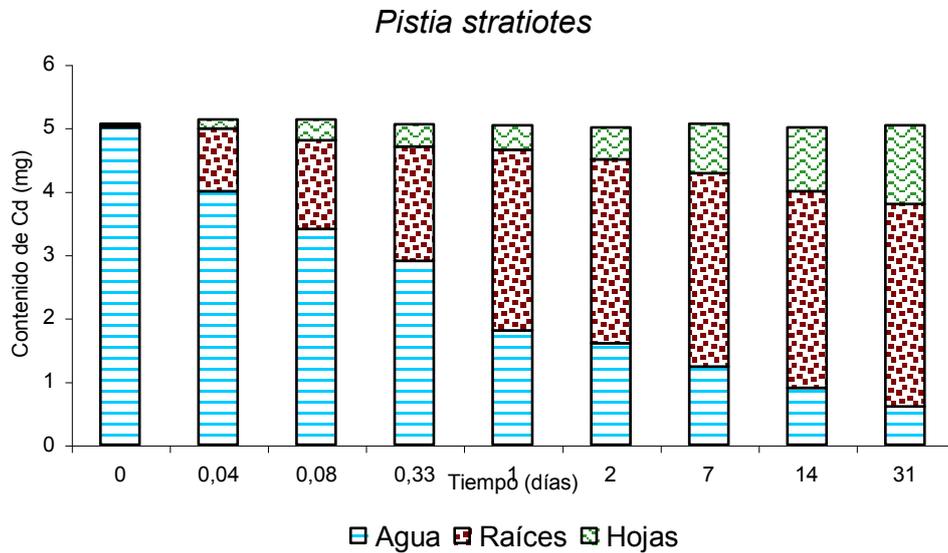


Figura 7.2.a.: Contenido de Cd en las distintas partes de la planta en función del tiempo.

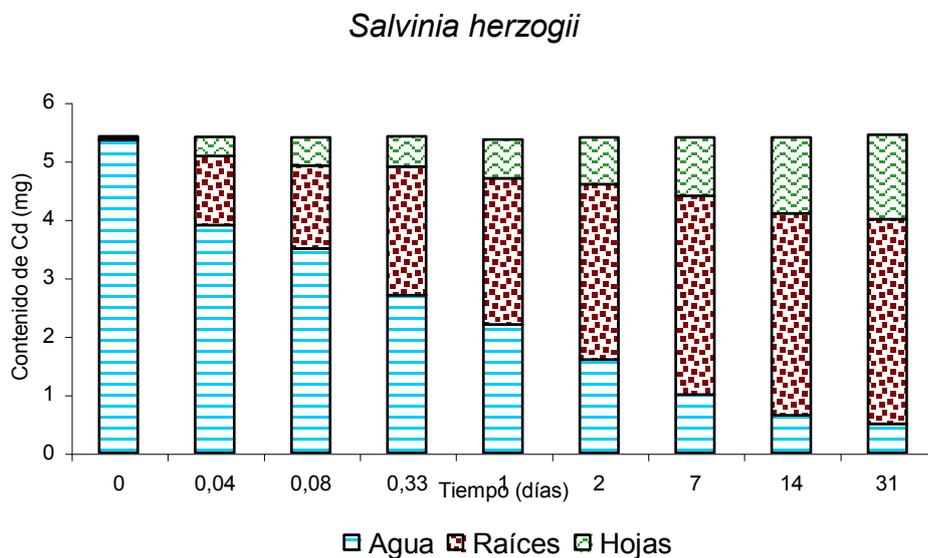


Figura 7.2.b.: Contenido de Cd en las distintas partes de la planta en función del tiempo.

La acumulación del metal en raíces fue aproximadamente el 22 % y del 20 % del Cd agregado durante los primeros 30 minutos de contacto y el 46 % y el 57 % del Cd agregado durante las primeras 24 horas, para *S. herzogii* y *P. stratiotes*, respectivamente. A los 31 días, el contenido de Cd en raíces fue el 65 % y el 64 % del Cd adicionado, respectivamente.

Respecto a las partes aéreas de ambas macrófitas y contrariamente a lo que ocurre con Cr, se observó un constante incremento en el contenido de Cd en parte aérea hasta el final de la experiencia, siendo la acumulación del metal del 6 % y 2 % del Cd agregado en los primeros 30 minutos, el 12 % y 8 % durante las primeras 24 horas y el 27 % y 25 % a los 31 días, para *S. herzogii* y *P. stratiotes*, respectivamente.

7.3. CONCLUSIONES

- Ambas especies acumulan tanto Cr como Cd principalmente en raíces y esta acumulación se produce fundamentalmente en las primeras 24 horas.
- En ambas especies, la acumulación de Cd en sus partes aéreas, parece ser un proceso continuo en el tiempo hasta el final de la experiencia.
- En ambas especies, el Cr fue pobremente acumulado en sus partes aéreas, produciéndose la misma durante las primeras 24 horas de contacto y sin cambios significativos hasta el final de la experiencia.

8- TRASLOCACIÓN DE Cr Y Cd EN LA PLANTA.

8.1. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

A fin de investigar si el incremento en la concentración de Cr y Cd en parte aérea de *S. herzogii* y *P. stratiotes* se debe a la translocación desde las raíces o a la sorción por contacto directo entre las partes aéreas y la solución, se evaluó si estas especies eran capaces de remover Cr y Cd de aguas contaminadas a través de su parte aérea.

Se dispusieron acuarios conteniendo agua y macrófitas con sus hojas en contacto con la solución (HT) y macrófitas las cuales sus hojas no hacen contacto con la solución (HNT). Para lograr esto último, se usaron delgadas planchas de poliestireno ranuradas, mediante las cuales solamente las raíces quedaron sumergidas. La fotos 8.1. a 8.4 muestran esta disposición.

Al evitar el contacto directo de las hojas con la solución, el aumento de concentración de metal en ellas se deberá exclusivamente a la translocación desde las raíces. Se adicionaron a los acuarios Cr(III) o Cd para alcanzar concentraciones de 1 y 6 mg l⁻¹. Para cada metal y para cada concentración, se tomaron muestras de agua y el total de la biomasa de cada acuario inicialmente y a 1, 4, 7, 14, 22 y 31 días. Se determinó la concentración de Cr o Cd en agua, en parte aérea y raíces y peso seco.



Foto 8.1



Foto 8.2.



Foto 8.3.



Foto 8.4.

8.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 8.1. muestran los resultados de la experiencia con Cr(III). A las dos concentraciones estudiadas, se observó que la capacidad de bioacumulación fue mayor en *S. herzogii* que en *P. Stratiotes*. El contacto o la pérdida de contacto con la solución (HT o HNT), el tiempo y a la especie de planta utilizada ejerció un efecto significativo sobre la concentración de Cr en raíces como así también en parte aérea

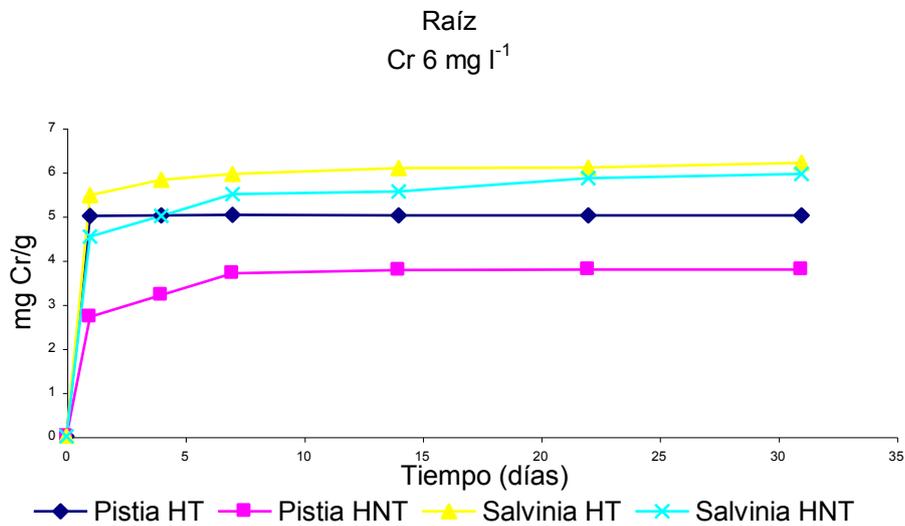
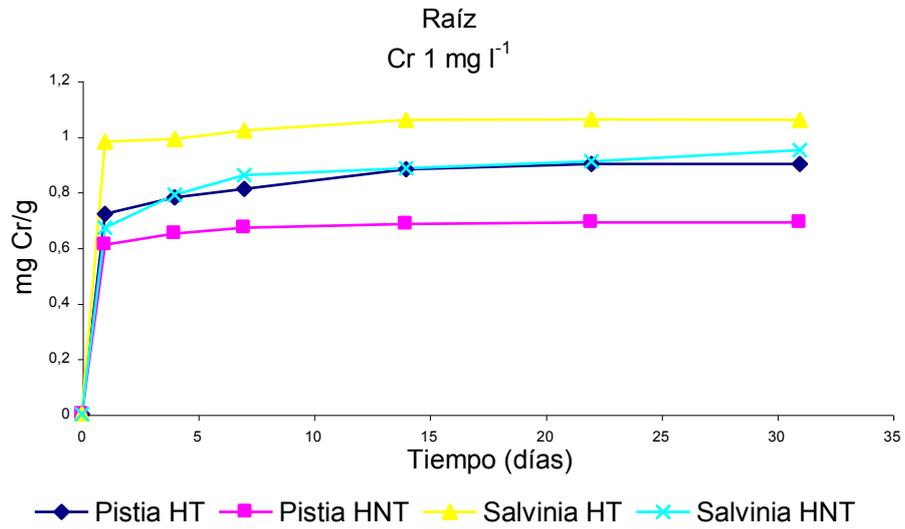
(ANOVA, $p < 0,05$, factores: HT-HNT, tiempo y especie de planta, aplicada a cada concentración estudiada).

En parte aérea se produjo, en todos los casos, un incremento en la concentración de Cr principalmente en las primeras 24 horas. A las dos concentraciones estudiadas, para la especie *S. herzogii*, la concentración de Cr en parte aérea de macrófitas HNT fue aproximadamente la quinta parte de la concentración de Cr en parte aérea de macrófitas HT. Esta relación fue de 1/3 para *P. stratiotes*, no mostrando variaciones significativas hasta el final de la experiencia. Estos resultados podrían indicar que la sorción de Cr por contacto directo con la solución es la principal causa del incremento de Cr en la parte aérea, siendo el Cr escasamente translocado desde las raíces. Fue reportado que en general las plantas tienen una baja capacidad para translocar Cr (Kabata-Pendias and Pendias, 1984, Jana, 1988, Chandra and Garg, 1992, Barceló and Poschneider, 1997). La aparente barrera para el transporte puede ser probablemente el almacenamiento preferencial del Cr en las vacuolas de las células del cortex de las raíces.

En consecuencia, tanto la translocación desde las raíces como así también, y en mayor medida, el contacto directo con la solución son responsables del incremento de Cr en parte aérea de las macrófitas estudiadas. Los experimentos ponen de manifiesto la importancia de la porción foliar como determinante de la bioacumulación de Cr en ambas macrófitas y tiene interés aplicado dado que la eficiencia de remoción dependerá en buena medida del contacto entre las hojas y la solución.

La concentración de Cr en raíces de macrófitas HT y HNT de ambas especies y a las concentraciones estudiadas aumentó principalmente durante las primeras 24 horas, continuó aumentando hasta el día 7, y a partir de allí y hasta el final de la experiencia no presentó

variaciones significativas. La concentración de Cr en raíces fue en todos los casos significativamente más alta en macrófitas HT que en macrófitas HNT.



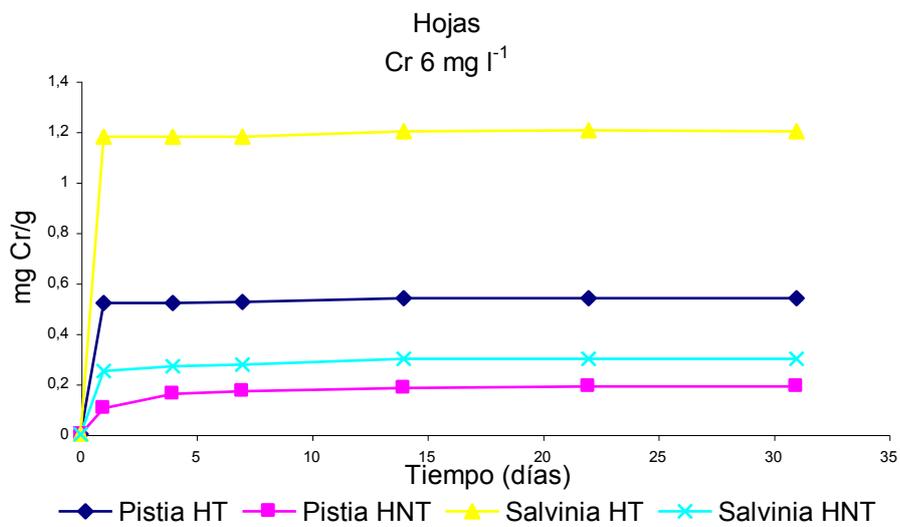
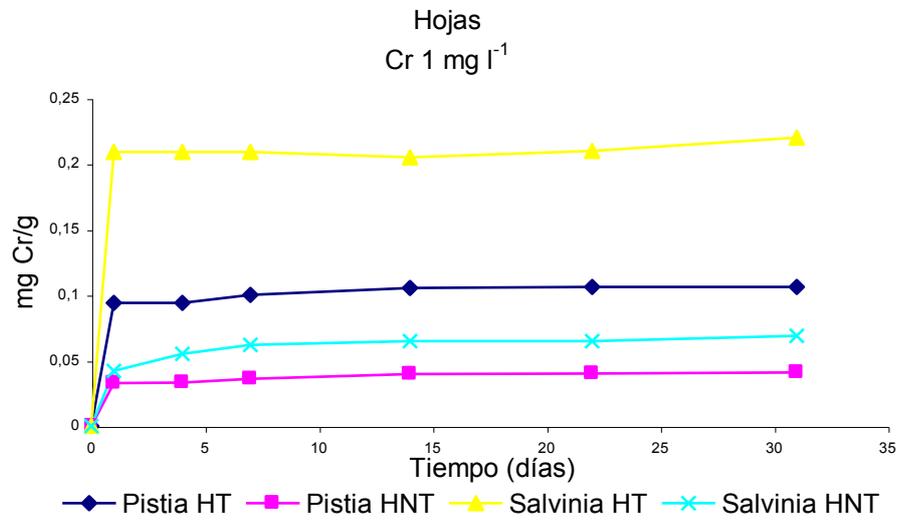


Figura 8.1.: Concentración de cromo en raíces y hojas (HT y HNT) de *P. Stratiotes* y *S. herzogii* a las dos concentraciones estudiadas.

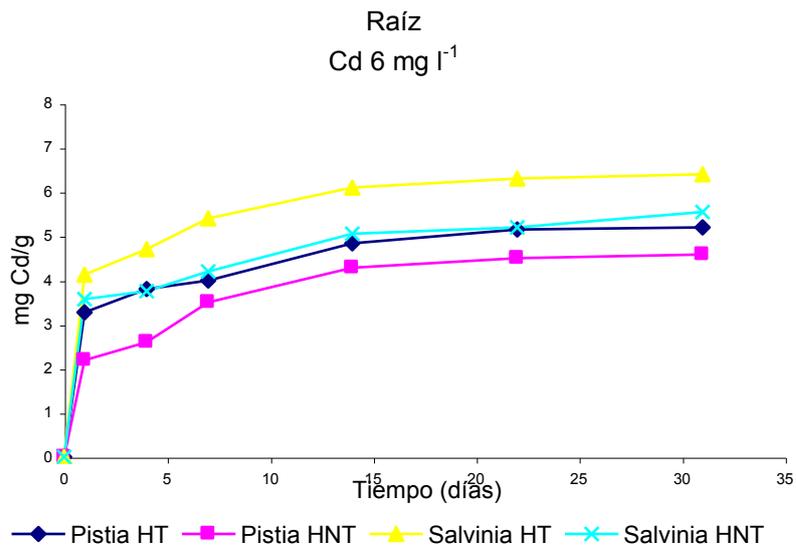
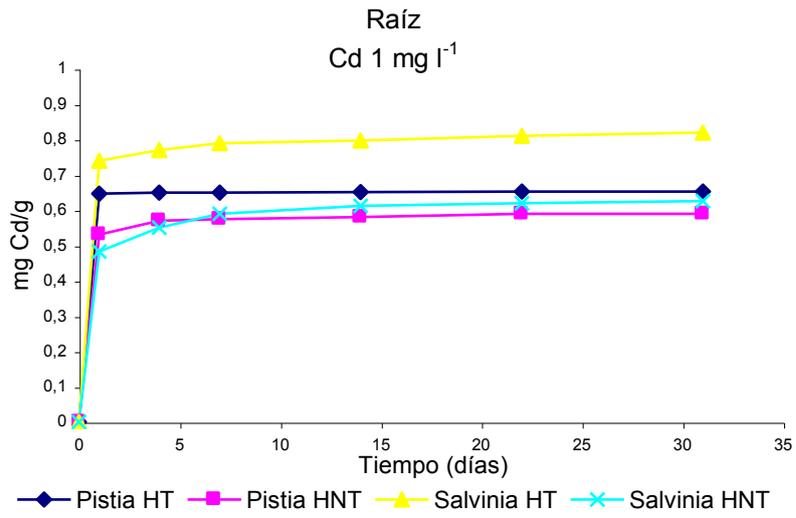
En las Figuras 8.2. se graficaron los resultados de la experiencia con Cd. También en este caso se observó que la capacidad de bioacumulación, a las dos concentraciones estudiadas, fue mayor en *S. herzogii* que en *P. stratiotes*. El contacto o la pérdida de contacto con la solución (HT o HNT), el tiempo y a la especie de planta utilizada ejerció un efecto significativo sobre la concentración de Cd en raíces y en parte aérea (ANOVA, $p < 0,05$, factores: HT-HNT, tiempo y especie de planta, aplicada a cada concentración estudiada).

En todos los casos estudiados, se observó que en parte aérea el principal incremento en la concentración de Cd se produjo durante las primeras 24 horas, tiempo en el cual, para la especie *S. herzogii*, la concentración de Cd en parte aérea de macrófitas HNT fue aproximadamente la cuarta parte de la concentración de Cd en parte aérea de macrófitas HT. Esta diferencia fue menor para *P. stratiotes*. Contrariamente a lo ocurrido con Cr, la concentración de Cd en parte aérea sigue aumentando en todos los casos hasta el final de la experiencia, manifestando que el proceso de translocación en ambas especies es muy diferente para los dos metales estudiados.

Al igual que lo hallado en la experiencia con Cr, el incremento en la concentración de Cd en parte aérea de macrófitas HNT, a las dos concentraciones estudiadas, no mostró diferencias significativas entre ambas macrófitas, lo que podría indicar que, para cada metal, el proceso de translocación es similar para ambas especies. También se encontró una diferencia notable en la concentración de Cd en parte aérea de macrófitas HT de ambas especies, siendo superior el contenido de Cd en *S. herzogii* que en *P. stratiotes*. Esto indicaría que, tanto para Cr como para Cd, el mecanismo de sorción por hojas es más importante en *S. herzogii* que en *P. stratiotes*, probablemente a causa de las características morfológicas de *S. herzogii*, ya que el área de contacto entre hojas y agua es mayor que en *P. stratiotes*.

Se puede proponer entonces, que tanto la translocación como el contacto directo con la solución son responsables del incremento de Cd en parte aérea de las macrófitas estudiadas.

La concentración de Cd en raíces de macrófitas HT y HNT de ambas especies a la concentración de 1 mg l^{-1} aumentó principalmente durante las primeras 24 horas y a partir de allí y hasta el final de la experiencia no presentó variaciones significativas. El mayor aumento en la concentración de Cd en raíces de macrófitas HT y HNT de ambas especies a la concentración de 6 mg l^{-1} se produjo en las primeras horas pero continuó aumentando hasta el día 22, manteniéndose sin variaciones significativas en el final de la experiencia. Similarmente a lo hallado con Cr, la concentración de Cd en raíces fue en todos los casos significativamente mayor en macrófitas HT que en macrófitas HNT. Por lo tanto, para ambos metales, se puede proponer que cuando se obstaculiza el proceso de sorción por hojas, la cinética de sorción a través de raíces se hace más lenta, probablemente debido a estrés causado a la planta por la perturbación.



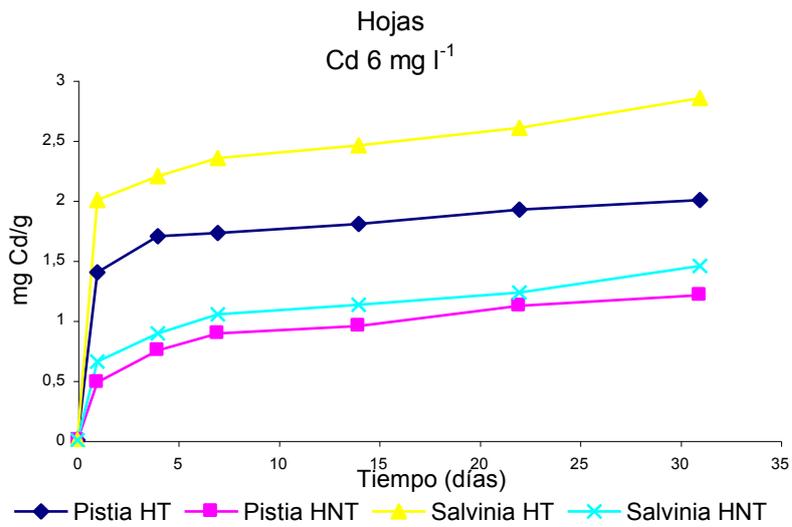
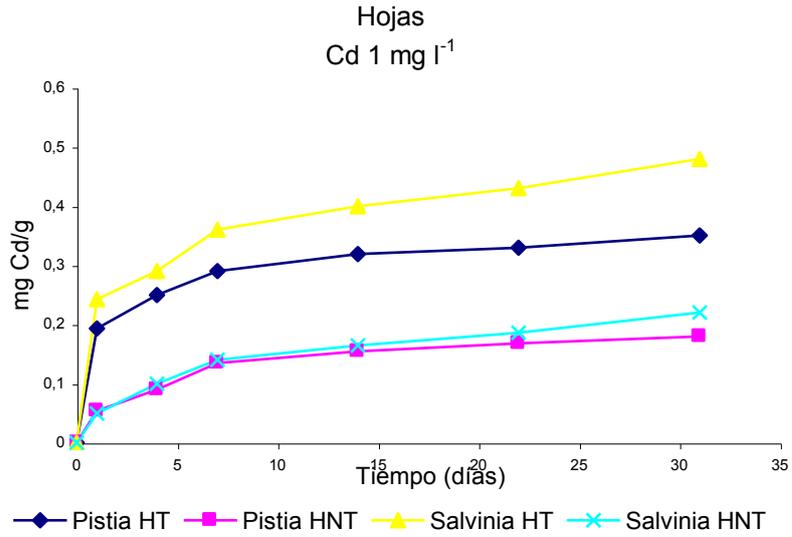


Figura 8.2.: Concentración de cadmio en raíces y hojas (HT y HNT) de *P. Stratiotes* y *S. herzogii* a las dos concentraciones estudiadas.

8.3. CONCLUSIONES

- Para cada metal, el proceso de translocación es similar para ambas especies.
- Para cada especie, el proceso de translocación es diferente para Cr y Cd.
- La sorción foliar de Cr por contacto directo con la solución es la principal causa del incremento de Cr en la parte aérea, siendo éste escasamente translocado desde las raíces.
- Tanto la translocación como la sorción foliar son responsables del incremento de Cd en parte aérea de las macrófitas estudiadas.
- La concentración de metal en raíces fue en todos los casos significativamente mayor en macrófitas HT que en macrófitas HNT, por lo que se puede proponer, que cuando el proceso de sorción por hojas se bloquea, la cinética de sorción a través de raíces se hace más lenta, probablemente debido a estrés causado a la planta por la perturbación.

9. DESORCIÓN DE Cd y Cr EN *P. stratiotes* y *S. herzogii*

9.1. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

Para identificar mecanismos de sorción de Cr y Cd por *P. stratiotes* y *S. herzogii*, se utilizó Ca^{2+} como catión competitivo por los sitios de enlace aniónico y EDTA como agente quelante para remover el metal del tejido vegetal por quelación.

Las macrófitas se colocaron durante 48 hs. en 1 litro de solución conteniendo 1 mg l^{-1} de Cr (III) o 1 mg l^{-1} de Cd. Luego el total de las macrófitas de cada tratamiento (Cr(III) o Cd) se separaron en tres partes. Una parte se colocó por 2 horas en soluciones de Ca ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) como catión competitivo, otra en EDTA para liberar el Cr y Cd por quelación y la última en agua destilada. Estas soluciones fueron, en molaridad, diez veces más concentradas que las concentraciones iniciales de metales. Luego de cada tratamiento, las macrófitas se separaron en hojas y raíces, y una vez lavadas y secadas en estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, se cuantificó la cantidad de Cr y Cd desorbidos, determinando las concentraciones de Cr y Cd en tejido vegetal, antes y después del tratamiento con Ca, EDTA o agua destilada. Estas experiencias se realizaron por triplicado. Se analizaron los resultados utilizando test de comparación de medias.

9.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la experiencia con Cd, la desorción en agua destilada fue menor al 2,5 % en todos los casos para las dos plantas.

En *S. herzogii* el Ca^{2+} intercambió el 30 % del Cd presente en la planta y el EDTA removió el 64 % del Cd presente en los tejidos. Similarmente, *P. stratiotes*, intercambió 29 % del Cd cuando la planta se colocó en solución de Ca^{2+} pero el intercambio en solución de EDTA fue mayor alcanzando el 75 % (Fig 9.1.a. y 9.1.b.). Cutler y Rains (1974) investigaron la toma de Cd por raíces de cebada separadas del resto de la planta desde una solución de cultivo e hipotetizaron que involucra tres mecanismos. El primero es adsorción de intercambio, en la cual el Cd es reversiblemente unido a los sitios de intercambio de las raíces y puede ser rápidamente intercambiado por soluciones de desorción (soluciones que contengan un gran exceso de otro metal de transición, por ej, Zn, Cu, Hg.) o soluciones de Ca. Salt et al (1997) encontraron que el 67 % del Cd acumulado en raíces de *Brassica juncea* fue intercambiado con una solución que contenía $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ más EDTA y asumieron que el Cd estaba adsorbido a la pared celular. El segundo mecanismo propuesto es el enlace no metabólico o secuestrante en un número limitado de sitios de la pared celular o macromoléculas de la célula. El tercer mecanismo, la difusión, se produce por un movimiento a través de la membrana celular. A través de esta experiencia podríamos reconocer los dos primeros mecanismos mencionados por Cutler y Rains (1974). También podría reconocerse el tercero, pensando en que el Cd que no fue liberado, ni por intercambio ni por quelación, probablemente podría haber difundido a través de la membrana celular.

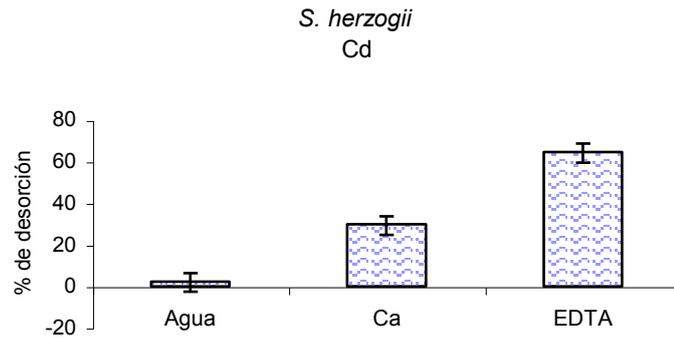


Figura 9.1.a.: Porcentajes de desorción de Cd en *S. herzogii* en las diferentes soluciones de desorción (agua destilada, Ca y EDTA).

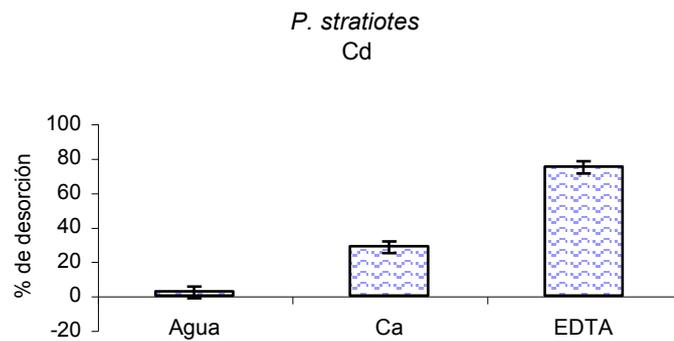


Figura 9.1.b.: Porcentajes de desorción de Cd en *P. stratiotes* en las diferentes soluciones de desorción (agua destilada, Ca y EDTA).

La desorción en agua destilada, en la experiencia con Cr, fue menor al 1% para las dos macrófitas.

Para el caso del Cr, en *S. herzogii*, el Ca intercambió el 29 % del Cr contenido en los tejidos y el EDTA liberó cerca del 65 % del Cr. En *P. stratiotes*, podría decirse que el Ca no provocó liberación de Cr (0,7 % del Cr sorbido) y el EDTA removió el 75 % del Cr presente en la planta (Fig 9.2.a. y 9.2.b.).

Kleiman y Cogliatti (1998), concluyeron en estudios realizados utilizando varias especies de plantas terrestres creciendo en soluciones de cultivo adicionadas con Cr(III), que éste es removido por las raíces de estas plantas desde la solución de cultivo, a través de tres caminos: absorción (transporte a través del plasmalema dentro de la célula), adsorción (fijación a las cargas negativas de las paredes celulares) y precipitación (formación de óxidos e hidróxidos cuando aumenta el pH de la solución). En nuestra experiencia descartamos la posibilidad de precipitación en forma de hidróxidos debido al aumento de pH de la solución, ya que el pH se mantuvo en todo momento en el rango establecido; pero se observó en *P. stratiotes*, en una experiencia anterior, la precipitación del Cr(III) sobre la superficie de la raíz probablemente provocada por exudados de las raíces. En cuanto a la desorción por intercambio iónico y por quelación, vemos que es significativamente menor que en el caso del Cd. Analizándolo desde la química básica, no es sorprendente, teniendo en cuenta el número de cargas, que el intercambio entre Cr y Ca sea menor que entre Cd y Ca, como así también y de acuerdo al valor de las constantes de formación condicionadas, el desplazamiento con EDTA de los compuestos de Cr formados. La desorción de Cr por intercambio iónico es significativamente diferente en las dos especies de macrófitas.

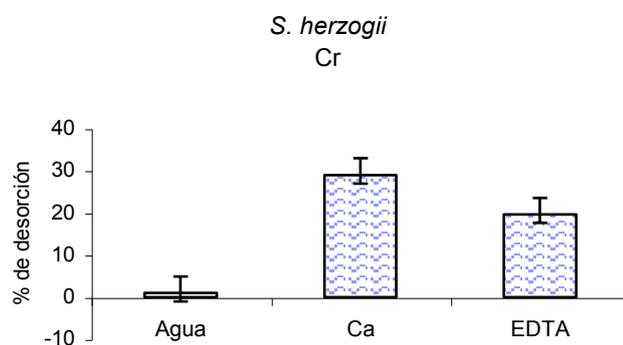


Figura 9.2.a.: Porcentajes de desorción de Cr en *S. herzogii* en las diferentes soluciones de desorción (agua destilada, Ca y EDTA).

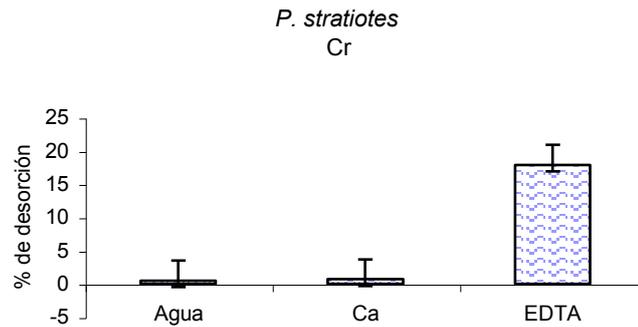


Figura 9.2.b.: Porcentajes de desorción de Cr en *P. stratiotes* en las diferentes soluciones de desorción (agua destilada, Ca y EDTA).

10.3. CONCLUSIONES

- Podría proponerse que las dos macrófitas estudiadas utilizan diferentes mecanismos para sorber Cr, ya que en *S. herzogii* tanto el intercambio iónico como la quelación fueron responsables de la desorción del Cr contenido en los tejidos. En cambio, en *P. stratiotes* solo la quelación mostró tener influencia.
- En el caso del Cd, para ambas especies tanto el intercambio iónico como la quelación fueron responsables de la desorción, indicando que podrían ser los principales mecanismos de sorción.

10. SORCIÓN DE CR Y CD EN RAÍCES SECAS

10.1. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

Con el objeto de evaluar la sorción de metales por parte de masa no viva de *P. stratiotes* y *S. herzogii*, se realizó una experiencia en laboratorio para la cual se utilizaron solamente sus raíces, las cuales, se lavaron cuidadosamente con agua de red a fin de eliminar todo resto de detritus adherido a sus tejidos, luego se enjuagaron con agua destilada y se secaron en estufa con corriente de aire seco a 20°C por 15 días. Para la experiencia se utilizó similar cantidad de masa vegetal seca que las usadas en experimentos con masa viva, de igual forma se seleccionaron las concentraciones de metal. Por lo expuesto se dispusieron acuarios conteniendo 1,50 g de raíces secas y 2 l de una solución conteniendo 7,5 mg l⁻¹ de Cr ó 21 mg l⁻¹ de Cd. El pH inicial en todos los acuarios fue el del agua destilada (4,5). Se dispusieron además acuarios control con raíces secas y sin metal. En los acuarios se determinó la concentración del metal inicialmente y a los 30 minutos, 1, 2, 8 y 24 horas. Además se midieron inicialmente y a las 24 horas las concentraciones en agua de Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ y H⁺.

Se determinó cualitativamente, utilizando los métodos para resinas, las propiedades de intercambio iónico de la masa vegetal seca. Se estimó la concentración de proteínas mediante el método Kjeldhal. El valor de Nitrógeno Kjeldhal hallado se multiplicó por la relación nitrógeno/proteína de 6,25.

El área superficial de las raíces se determinó utilizando el método BET con N₂ líquido, a cortos tiempos de adsorción (condiciones de equilibrio aproximadamente 2 horas). Se halló además la cantidad de grupos ácidos superficiales y totales. Para estos ensayos fue necesario cortar las raíces en porciones de aproximadamente 5 mm.

Para la determinación de grupos ácidos superficiales sobre las muestras de raíces, previamente acondicionadas de forma tal que los grupos ácidos se encuentren en su forma sódica, se realizó la isoterma de adsorción utilizando como electrolito de adsorción cloruro de Poli-DiMetilDiAlilAmonio, titulando el exceso no adsorbido con polyvinilsulfato de potasio, utilizando como indicador azul de o-toluidina y siguiendo la absorbancia del indicador a 628 nm por circulación a través de un espectrofotómetro (ReflectaScan CE 3055). Sobre las curvas de adsorción se ajustó un modelo desarrollado para sistemas fibras – polielectrolito por Mocchiutti y Zanuttini (2002). Para la determinación de grupos ácidos totales, las muestras secas se humectaron durante 8 horas y se desintegraron, luego se realizaron dos sucesivos tratamientos ácidos (pH=2, 40 minutos) y luego se lavaron con agua destilada hasta conductividad en el filtrado menor a 7 μ S. Luego se llevó a cabo una titulación conductimétrica, utilizando NaHCO₃ como titulante.

10.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 10.1. muestra los porcentajes de remoción de Cr y Cd de *P. stratiotes* y *S. herzogii*. Se puede observar que ambas macrófitas presentan porcentajes de remoción significativamente mayores para Cd que para Cr cuando se encuentran a similares concentraciones (expresadas en normalidad). La Figura 10.2. muestra la remoción pero en miliequivalentes del metal por gramo de raíz utilizada para la remoción. Los resultados son diferentes a los hallados como porcentajes de remoción, ya que se determinó que *S. herzogii* remueve un número significativamente mayor de

miliequivalentes de Cr o Cd que *P. stratiotes* por gramo de raíz utilizada en la experiencia.

(ANOVA, tres factores: especies, tiempo y metal, $p < 0,05$).

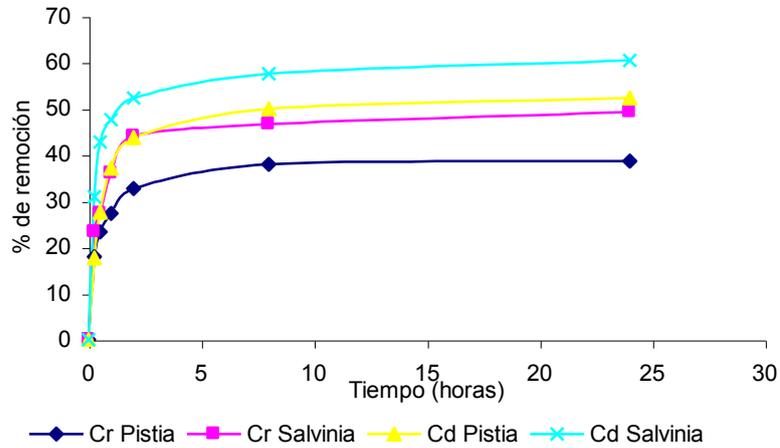


Figura 10.1.: Porcentajes de remoción de Cr y Cd de aguas por raíces secas de *P. stratiotes* y *S. herzogii*.

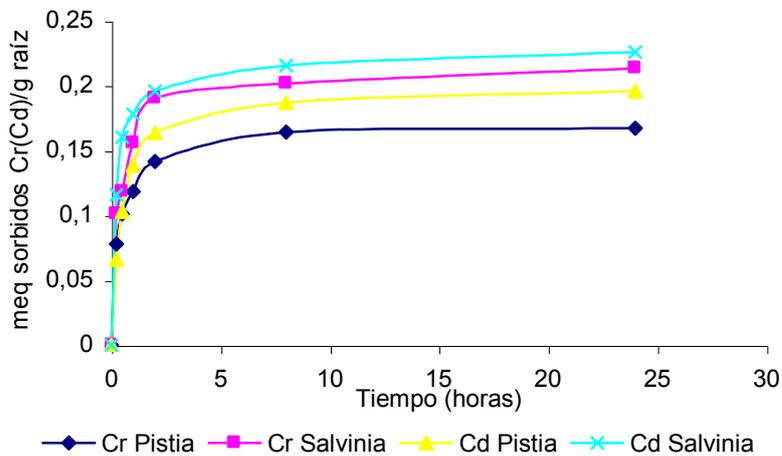


Figura 10.2.: Miliequivalentes de Cr y Cd removidos de la solución por gramo de raíces secas.

Tabla 10.1.: Concentraciones medias de iones metálicos (mg l⁻¹) en los acuarios inicialmente y luego de 24 hs de exposición de 1,5 g (peso seco) de raíces *P. stratiotes* y *S. herzogii* en soluciones conteniendo Cr(III) o Cd.

Ion	<i>P. stratiotes</i>					<i>S. herzogii</i>				
	Cr		Cd		Control	Cr		Cd		Control
	Conc. Inicial	Conc. Final	Conc. Inicial	Conc. Final	Conc. Final	Conc. Inicial	Conc. Final	Conc. Inicial	Conc. Final	Conc. Final
Na ⁺	ND	8,9	ND	8,0	9,5	ND	9,2	ND	9,7	8,7
K ⁺	ND	32,8	ND	40,3	30,2	ND	26,5	ND	25,7	26,0
Ca ²⁺	ND	3,4	ND	1,1	3,5	ND	3,3	ND	3,9	2,4
Mg ²⁺	ND	8,1	ND	8,2	6,8	ND	1,7	ND	1,8	2,5
Fe _{tot}	0,020	0,137	0,015	0,152	0,135	0,020	0,214	0,015	0,425	0,249
pH	4,50	5,97	4,50	6,15	6,42	4,50	5,35	4,50	5,96	6,46
Cr ³⁺ /Cd ²⁺	7,5	4,6	21	10	ND	7,5	3,8	21	8,3	ND

En la Tabla 10.1. se observan las concentraciones de iones metálicos antes y después de la sorción de Cr y Cd en acuarios conteniendo raíces no vivas de *P. stratiotes* y *S. herzogii*. Si bien se produjo una importante liberación de iones a la solución en los acuarios con agregado de Cr y Cd, esta liberación también se produjo en los acuarios control, contrariamente a lo expresado por Schneider y Rubio (1999) para tres macrófitas flotantes (*P. lucens*, *S. herzogii*, *E. crassipes*) cuando se las perturbaba con Cu.

El balance iónico (Tabla 10.2) mostró que cuando la solución utilizada de 7,5 mg l⁻¹ (aproximadamente 0,43 meq l⁻¹) de Cr³⁺ está en contacto con raíces (de plantas no vivas) de *P. stratiotes*, 2,067 meq l⁻¹ de Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y Fe³⁺ se liberaron a la solución y 2,070 meq l⁻¹ de H⁺ y Cr³⁺ fueron adsorbidos por raíces muertas de *P. stratiotes*. H⁺ y Cr³⁺ fueron aproximadamente el 92 y el 8 % respectivamente del total de iones adsorbidos por *P. stratiotes* y los iones monovalentes representaron aproximadamente el 60 % de los iones liberados a la solución mientras que los polivalentes el 40 %. A través del mismo análisis,

cuando esta solución de $7,5 \text{ mg l}^{-1}$ de Cr^{3+} está en contacto con raíces (de plantas no vivas) de *S. herzogii*, $1,396 \text{ meq l}^{-1}$ de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} (77 % monovalentes y 23 % polivalentes) se liberaron a la solución y $1,394 \text{ meq l}^{-1}$ de H^+ (85 %) y Cr^{3+} (15 %) fueron adsorbidos por raíces no vivas de *S. herzogii*.

De la misma forma el balance iónico mostró que cuando la solución de 21 mg l^{-1} (aproximadamente $0,38 \text{ meq l}^{-1}$) de Cd^{2+} está en contacto con raíces (de plantas no vivas) de *P. stratiotes*, $2,117 \text{ meq l}^{-1}$ de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} se liberaron a la solución (65 % monovalentes y 35 % polivalentes) y $2,115 \text{ meq l}^{-1}$ de H^+ (91 %) y Cd^{2+} (9 %) fueron adsorbidos por raíces no vivas de *P. stratiotes*. Cuando la solución de 21 mg l^{-1} de Cd^{2+} está en contacto con raíces (de plantas no vivas) de *S. herzogii*, $1,471 \text{ meq l}^{-1}$ de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} (75 % monovalentes y 25 % polivalentes) se liberaron a la solución y $1,468 \text{ meq l}^{-1}$ de H^+ (85 %) y Cd^{2+} (15%) fueron adsorbidos por raíces muertas de *S. herzogii*. Miretzky et al. (2006) reportaron similares resultados cuando trabajaron con biomasa no viva de *Spirodela intermedia*, *Lemna minor* y *P. stratiotes* utilizando una solución multimetal (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+}). A pesar de los bajos porcentajes de miliequivalentes de Cr y Cd adsorbidos respecto del total de iones adsorbidos en las raíces de *S. herzogii* y *P. stratiotes*, estos metales, como se observa en la Figura 10.1, fueron satisfactoriamente removidos de la solución (30-60 % de remoción).

Tabla 10.2.: Miliequivalentes de Cr^{3+} y Cd^{2+} removidos de la solución de estudio y los de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{3+} liberados a la solución al finalizar la experiencia. Se expresan los valores medios.

Ion		P. stratiotes			S. herzogii		
		Cr	Cd	Control	Cr	Cd	Control
Miliequivalentes liberados a la solución	Na^+	0,390	0,346	0,414	0,400	0,446	0,413
	K^+	0,840	1,033	0,770	0,679	0,659	0,669
	Ca^{2+}	0,170	0,055	0,175	0,165	0,195	0,120
	Mg^{2+}	0,660	0,675	0,560	0,140	0,148	0,209
	Fe_{tot}	0,007	0,008	0,007	0,012	0,023	0,013
	Sumatoria	2,067	2,117	1,926	1,396	1,471	1,424
Miliequivalentes Sorbidos de la solución	$\text{Cr}^{3+}/\text{Cd}^{2+}$	0,165	0,196		0,214	0,226	
	H^+	1,905	1,919	1,925	1,180	1,242	1,419

P. stratiotes y *S. herzogii* (Tabla 10.3.) presentaron propiedades catiónicas débiles. *P. stratiotes* presentó mayor área superficial y mayor concentración de grupos ácidos superficiales que *S. herzogii*, mientras que la concentración de grupos ácidos totales y de proteínas fue mayor en ésta última.

La Tabla 10.3.muestra la caracterización de las raíces de *P. stratiotes* y *S. herzogii*.

Tabla 10.3.Caracterización de las raíces de *P. stratiotes* y *S. herzogii*.

Propiedad	<i>S. herzogii</i>	<i>P. stratiotes</i>
Área Superficial	2,2 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	4,9 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$
Propiedades de intercambio iónico	Catiónica débil	Catiónica débil
Grupos ácidos superficiales	0,0474 meq g^{-1}	0,1202 meq g^{-1}
Grupos ácidos totales	0,4015 meq g^{-1}	0,3571 meq g^{-1}
Proteínas	11, 5 %	10,2 %

Se han utilizado diferentes técnicas de medición de áreas superficiales de biomasa de plantas secas, obteniéndose diferentes valores dependiendo de la técnica utilizada (Wang, 1995; De Jonge y Mittlemeijer-Hazeleger, 1996; Schneider et al. 1995; Schneider, 1995; Ribeiro et al., 1998; Bower and Gschwend, 1952.). Las áreas superficiales medidas con el método BET utilizando N_2 y a 77 K son mucho menores a aquellas determinadas usando otros métodos (Schneider, et al, 2001). De Jonge y Mittlemeijer-Hazeleger (1996) llegaron a la conclusión que la adsorción de N_2 a 77 K no medirá poros menores a 0,5 nm si no se consideran tiempos de adsorción largos (semanas). Se cree que en esta determinación se incluyen poros entre 0,5 y 2 nm, donde la condensación capilar puede tener lugar. Schneider et al (1995) midieron áreas superficiales de varias partes de *E. crassipes*, inicialmente encontraron áreas entre 2 y 5 $m^2 g^{-1}$ y luego de varios días midieron áreas entre 150 y 280 $m^2 g^{-1}$. Ruthven and Kaul (1993) sugirieron que en muchos sistemas la velocidad de difusión en los poros de un sólido poroso está gobernada primariamente por la libertad rotacional de la molécula que difunde y además a la barrera de energía asociada con la penetración de las restricciones de poro. Si pensamos en los metales como las moléculas que difunden, estos pueden estar presentes en la superficie de la biomasa o pueden estar introducidos en el poro. En este último caso, sería muy dificultoso desorber estos iones metálicos. Midiendo el área a cortos tiempo de adsorción estaríamos midiendo el área disponible para los procesos de adsorción o intercambio iónico rápidos que efectivamente ocurren durante las primeras horas de contacto con la solución.

Los grupos carboxílicos libres podrían probablemente proporcionar los sitios de enlace con los metales. Los grupos carboxílicos totales están relacionados al contenido de proteínas en los tejidos: a mayor cantidad de proteínas, mayor concentración de grupos carboxílicos. Las proteínas y otros tejidos biológicos, poseen átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre, que actúan como importantes átomos ligando y pueden también jugar un rol

fundamental en la sorción de iones metálicos. Li et al., 1998, encontraron una relación de la adsorción de Cd a materia orgánica con el pH utilizando espectrometría RMN de Cd-113. A pH ácidos o ligeramente ácidos el metal se acompleja a los átomos O donante de electrones, probablemente de los grupos carboxílicos, mientras que a elevados pH observaron la coordinación del metal a átomos N y no observaron evidencias de la formación de enlaces entre el metal y átomos de S en los espectros RMN. Sin embargo Fuyita, 1985, trabajando con *E. crassipes* cultivada en un medio adicionado con Cd, encontró, utilizando análisis cromatográficos, que éste se presentó dentro de la planta en dos formas de elevado peso molecular que demostraron ser Cd tioneínas, es decir Cd acomplejado al S de proteínas.

P. stratiotes presentó mayor área superficial y mayor cantidad de grupos carboxílicos superficiales que *S. herzogii* y efectivamente fue la que mostró mayor cantidad de miliequivalentes iónicos intercambiados, pero fue mayor la sorción de Cr o Cd en *S. herzogii* en coincidencia a una mayor concentración de grupos carboxílicos totales y de proteínas. Esto demuestra que estas dos especies presentan diferentes procesos de sorción, y que esto se debe a sus diferentes características químicas y morfológicas.

9.3. CONCLUSIONES

- Raíces no vivas de *P. stratiotes* y *S. herzogii* remueven eficientemente Cr y Cd de la solución.
- La masa no viva de estas macrófitas acuáticas actúa como material de intercambio catiónico débil.

- El principal mecanismo involucrado en la sorción fue el intercambio entre iones monovalentes presentes en la biomasa y los iones metálicos pesados (Cr y/o Cd) y los protones tomados de la solución.
- Si bien *P. stratiotes* intercambió mayor cantidad de iones totales, *S. herzogii* intercambió mayor cantidad de Cr y Cd, demostrando ser más eficiente en la remoción de los mismos.
- La sorción de Cr y Cd por raíces secas de *P. stratiotes* y *S. herzogii* podría tomarse en cuenta como un tratamiento eficiente y de bajo costo para el tratamiento de efluentes industriales, ya que plantas vivas o no vivas demuestran ser eficientes en la remoción de estos metales.

11. EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS EN LA REMOCIÓN DE Cr (VI)

11.1. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

Existen pocos estudios sobre la sorción de Cr(VI) por macrófitas acuáticas (Sen et al., 1987); y es menor aún la información disponible acerca de la composición, abundancia e influencia que eventualmente ejercen los microorganismos que se hallan naturalmente asociados a las mismas (Lytle et al,1998). Asociados a las raíces de macrófitas acuáticas pueden encontrarse microorganismos resistentes al Cr (VI) que contribuyen a su reducción (Lytle et al, 1998). La reducción microbiológica de Cr (VI) a Cr (III) ha sido demostrada por varios investigadores (Nies, 1992; Shen & Wang, 1993; Turick et al, 1996). Se ha sugerido que esta reducción es un mecanismo de resistencia adicional al cromato codificado en el cromosoma, en adición a la tolerancia codificada en el plasma (Cervantes & Silver, 1992; Ohtake & Silver, 1994). Algunas bacterias tienen la capacidad de reducir Cr (VI) en aerobiosis, por ejemplo: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas ambigua*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp, *Pseudomonas fluorescens* (Silver & Williams, 1984; Lovley, 1993; Ohtake & Silver, 1994, Wakatsuki, 1995). *Enterobacter cloacae* HO1, descrita como resistente al cromato (Wang et al, 1989), es el ejemplo más estudiado de bacteria que reduce el Cr (VI) (Ohtake & Silver, 1994). *Bacillus* sp . QC1-2, especie aislada en zonas contaminadas con Cr, es tolerante al cromato y de reducir el Cr (VI) a Cr (III) (Campos et al, 1995). Se han identificado bacterias, como *P. ambigua* G1, de las cuales se ha purificado la Cr reductasa NADPH-dependiente, la cual es la responsable de la reducción de Cr (VI) a Cr(III) (Wang et al, 1989).

En la mayoría de los casos estudiados, la acumulación de Cr en hongos resistentes al cromato fue mucho mayor que en especies sensibles al cromato, sin embargo, los procesos de biosorción y bioacumulación fueron similares (Czakó-Vér et al, 1999). En el

contexto de la bioremediación, la habilidad de biosorción de mutantes resistentes al cromato puede combinarse con su habilidad de reducir el cromato. Especies resistentes al cromato de *Aspergillus* spp. (Paknikar & Bhide, 1993) y *Cándida* spp. (Ramírez-Ramírez et al, 2000), aisladas de ambientes contaminados con Cr, mostraron actividad de reducción de Cr (VI).

Si bien existen referencias bibliográficas sobre bacterias y hongos que reducen Cr (VI) de manera eficiente, estos trabajos se realizaron utilizando cepas específicas, aisladas y cultivadas de manera controlada en reactores de laboratorio (Czakó-Vér et al, 1999, Ramírez-Ramírez et al, 2000, Ohtake & Silver, 1994). Hasta donde llega nuestro conocimiento, la información disponible sobre la eventual importancia de la actividad biológica en la rizósfera de plantas acuáticas tomadas de ambientes naturales es prácticamente inexistente.

En razón de lo anterior, el objetivo de esta experiencia es determinar si la presencia de microorganismos, bacterias, levaduras y hongos, asociadas naturalmente a raíces de *S. herzogii* afecta la sorción del Cr (VI) disuelto en el agua de río.

Se realizó un relevamiento previo de los mohos y bacterias naturalmente presentes en raíces de *S. herzogii* para establecer el tipo de antifúngico y antibacteriano a utilizar en la experiencia. Para determinar la presencia de mohos se utilizó el medio de cultivo MEA (agar extracto de malta), se sembraron tres porciones de 5 mm de largo de raíz en cada placa de Petri y se incubó 7 días a 25 ° C y 37 ° C. Para la identificación se utilizaron las guías de Pitt and Hocking (1997). Se realizó una identificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas (Mac Faddin, 1980; Finegold and Baron, 1998) teniendo en cuenta las especies capaces de reducir Cr (VI), encontradas en la bibliografía (Cervantes et al., 2001). Esta identificación fue realizada por la Dra. Cristina Lurá de Calafell, de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL.

Se comparó la reducción de Cr en tratamientos con y sin actividad microbiológica. A tal efecto en el tratamiento sin actividad, esta se inhibió con el agregado del antifúngico Anfotericina B de 50 mg y del antibacteriano Ciprofloxacina 500 mg.

Se prepararon 4 reactores plásticos conteniendo 3,5 l. de agua de río estéril. (esterilización realizada por el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de la UNL).

Reactor 1 (T): sin agregados, se tomó como testigo,

Reactor 2 (AB): se le adicionaron 20 mg/l de Ciprofloxacina (antibacteriano),

Reactor 3 (AF): se le adicionaron 5 mg/l de Anfotericina (antifúngico)

Reactor 4 (ABF): se le agregaron 20 mg/l de Ciprofloxacina y 5 mg/l de Anfotericina.

Las plantas se lavaron con agua corriente y se secaron al aire. Se colocaron 50 g de *S. herzogii* en cada uno de los reactores, los que se mantuvieron en esas condiciones durante 1 semana para permitir la adecuada eliminación de los microorganismos de las raíces. Transcurrido el pretratamiento, a cada uno de los reactores se le agregó una solución de cromato, para lograr una concentración en agua de 5 mg l^{-1} de Cr como $\text{CrO}_4^{=}$ regulando el pH a 7,2. Se mantuvieron los reactores en condiciones aeróbicas y protegidos de la contaminación ambiental. Los reactores se dispusieron por duplicado.

Los muestreos realizados fueron los siguientes: inicial, 1 h., 2 h., 8 h., 24 h., 48 h. y 7 días. Se determinó Cr^{+6} en el agua mediante la técnica colorimétrica (APHA 1998).

11.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microorganismos encontrados en las plantas de *S. herzogii* recolectadas de la laguna fueron los siguientes: *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Bacillus*

sp., *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter* spp., *Pantoea* sp., *Rhodotorula* spp., *Streptococos*, bacilos Gram - y *Escherichia coli*. De acuerdo a la bibliografía, las bacterias presentes en las plantas utilizadas en la experiencia, que podrían reducir Cr(VI) son: *E. coli*, *E. cloacae* y *Bacillus* spp. El hongo que tendría esta misma capacidad es *Aspergillus* spp.

Los porcentajes de remoción de Cr (VI) al final de la experiencia fueron los siguientes: T: 19,4 %, AB: 21,6 %, AF: 15,7 % y ABF: 17,3 %. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes finales de remoción de los diferentes tratamientos, siendo T y AB significativamente mayores que AF y ABF, (ANOVA, $p < 0,05$). Sin embargo, analizando los resultados a lo largo de toda la experiencia (ANOVA un factor: tratamiento y bloques: tiempo); el reactor AB resultó significativamente diferente a los demás ($p < 0,05$). Esta diferencia se observa en la gráfica de remoción (Figura 11.1.), que muestra que en el reactor con antibacteriano, donde solamente hay presencia de hongos, la remoción se produce con mayor velocidad que en los restantes. Este resultado indicaría que los hongos afectan el proceso de remoción de Cr(VI) en agua. La diferencia con el reactor testigo puede deberse a que al disminuir la población de bacterias, los hongos se desarrollan en mayor cantidad porque no compiten con las bacterias.

En el reactor AF donde se eliminó o disminuyó la población de hongos, y solo permanecía la población bacteriana, los porcentajes de remoción fueron más bajos, y no presentaron diferencia significativa con el reactor ABF, donde se disminuyó tanto la población de hongos como de bacterias, indicando que las bacterias presentes en las raíces de las macrófitas no tendrían una influencia significativa sobre la remoción de Cr(VI).

Como las macrófitas acuáticas sorben Cr(III) más eficientemente que Cr (VI), se ha propuesto que el Cr (VI) es reducido a Cr(III) en la microzona de las raíces antes de su

ingreso a la planta (Lytle et al, 1998). Probablemente, los hongos favorezcan la reducción de Cr(VI) a Cr (III), posibilitando así la sorción del mismo por la planta. De cualquier manera, los porcentajes de remoción de Cr (VI) hallados en esta experiencia como los obtenidos en la experiencia de bioacumulación son significativamente más bajos que los de Cr(III).

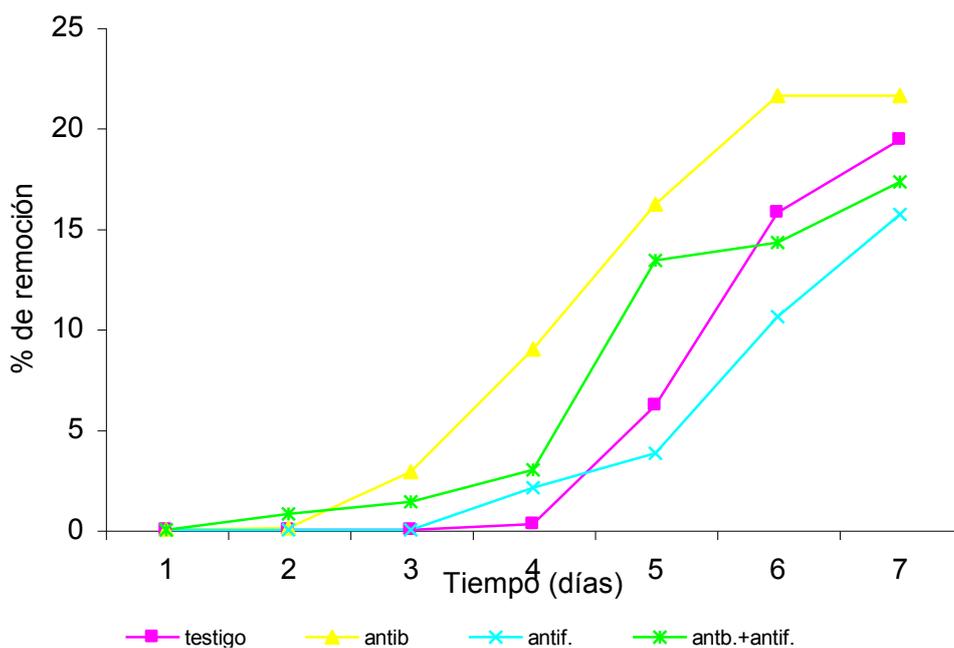


Figura 11.1.: Porcentajes de Remoción de Cr (VI) en agua para los distintos reactores en función del tiempo.

11.3. CONCLUSIONES

- Los hongos naturalmente presentes en las raíces de *S. herzogii* participan en el proceso de remoción de Cr(VI), mientras que la presencia de bacterias no tiene una influencia significativa.

12. ANÁLISIS QUÍMICO POR RAYOS X

12.1. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

A fin de obtener patrones de distribución de Cr y Cd en *P. stratiotes* y *S. herzogii* se realizó un estudio basado en técnicas analíticas nucleares tales como Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis de Rayos X Dispersivo en Energía con Sonda de Electrones. Las macrófitas se colocaron en soluciones conteniendo 20 mg l^{-1} de Cr (III) ó Cd durante 48 hs. Se realizó un ensayo testigo, colocando las macrófitas en agua destilada. En otro ensayo se colocaron las plantas en una solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ de 10 mg l^{-1} de Cr durante 48 hs. Las plantas tratadas y plantas testigos se separaron en raíces y hojas y se secaron en corriente de aire seco a 20°C por 10 días para no dañar los tejidos. En primer término se realizó un análisis longitudinal de las raíces seleccionando tres zonas: cuello, medio y ápice, y además la cara adaxial y la abaxial de las hojas. Por último las raíces de las plantas tratadas con Cr (III) y Cd se colocaron en aire líquido, y por criofractura se obtuvo la sección transversal. Para realizar el análisis se seleccionaron también tres zonas: superficie de la raíz, córtex y pared de la médula. Se obtuvieron además micrografías de las zonas analizadas.

Los cortes de raíces y hojas se adhirieron con cinta doble faz de grafito sobre portamuestras del mismo material. Posteriormente se recubrieron con un film de grafito por evaporación al vacío utilizando un evaporador VEECO VE-300. Este método permite mantener las características morfológicas y químicas de las muestras.

Los análisis se llevaron a cabo con un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL, modelo JSM-35C equipado con un analizador de rayos X dispersivo en energía, de Si(Li),

marca EDAX, modelo PV9100, en el Secegrin, Ceride, Santa Fe. Esta técnica, conocida como Microanálisis de Rayos X por Sonda de Electrones (EPMA), permite detectar sólo aquellos elementos cuyo número atómico esté comprendido entre 11 (sodio) y 92 (uranio) inclusive. La metodología analítica empleada considera, por lo tanto, como el cien por ciento al total de elementos presentes detectados. La distribución porcentual se expresa en base a esta consideración (%p/p). La información experimental obtenida proviene de una región superficial de la muestra, pudiendo esta alcanzar una profundidad de hasta una decena de micrones, según el material analizado. Dicha información se representa en forma de espectro o gráfico de intensidad de la señal (proporcional a la concentración del elemento químico en la muestra), en función de la energía de los rayos X. La adquisición de los espectros fue realizada bajo las mismas condiciones operativas. Las micrografías se obtuvieron a partir de imágenes de electrones secundarios a una tensión de aceleración de 20 Kv y la adquisición de las imágenes fue realizada en forma digital empleando el sistema SemAfore. Los espectros de rayos X se obtuvieron a la misma tensión de aceleración durante un intervalo de tiempo de 300 segundos de vida para el análisis longitudinal y de 360 para el transversal, tiempo suficiente para proporcionar una buena relación señal/ruido.

12.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los elementos encontrados en las plantas estudiadas fue Silicio (Anexo II, Espectros de las distintas zonas analizadas para *P. stratiotes* y *S. herzogii*). Como se observa en los espectros, la abundancia relativa es muy variable, incluso en diferentes partes de una misma muestra, por lo que en muchas ocasiones, cuando la abundancia relativa fue realmente

elevada, su presencia pudo deberse casi exclusivamente a la sílice (arena) adherida a los tejidos de las plantas. Por este motivo se eliminó su contenido y se recalcularon los porcentajes de p/p del resto de los elementos. De esta forma se pueden realizar comparaciones entre las distintas partes analizadas. Estos valores se presentan en las Tablas 12.1. y 12.2. para *P. stratiotes* y *S. herzogii*, respectivamente.

En el análisis de hojas y raíces de plantas testigo no se detectaron los metales estudiados. El análisis longitudinal en raíces expuestas a Cr(III) demostró que el Cr se acumuló en ambas especies preferentemente en el ápice. En hojas de *P. stratiotes* no se detectó Cr través de la metodología empleada, mientras que el análisis en hojas de *S. herzogii* demostró mayor acumulación de este metal en la cara abaxial. Estos resultados están de acuerdo a lo hallado en la experiencia de translocación por lo que puede proponerse que la presencia de Cr en hojas de *S. herzogii* se debe principalmente a la sorción por contacto directo de las hojas y la solución debido a la disposición de las mismas en contacto con la superficie del agua.

El análisis transversal en raíces expuestas a Cr(III) mostró para ambas especies mayor acumulación de Cr en la superficie de la raíz, disminuyendo su concentración en forma centripeta. Estos resultados coinciden con que el Cr(III) en estas especies es escasamente translocado a la parte aérea.

Se analizó además, la zona de los precipitados observados en las raíces de *P. stratiotes*, en la cual los únicos elementos hallados fueron Al (4 %), Cl (4 %), K (17 %), Cr (45 %), Mn (9 %) y Fe (21 %), Esto indica que no solo se produce la precipitación de Cr, sino también la precipitación de elementos vecinos a él en la tabla periódica (Mn y Fe), los

cuales tienen similares características químicas. Estos precipitados no se observaron en raíces de *S. herzogii*.

Debido a la baja tolerancia al Cr (VI) por parte de las macrófitas estudiadas, se utilizaron concentraciones de Cr (como $K_2Cr_2O_7$) más bajas que las utilizadas en la experiencia con Cr (III). Además en experiencias anteriores se determinó que la sorción de Cr (VI) es significativamente inferior que la sorción de Cr(III). Por estas razones, en las macrófitas expuestas a Cr (VI) solo se detectó Cr en raíces de ambas especies, sin que existiesen diferencias significativas entre las diferentes zonas analizadas. Los bajos % p/p de Cr hallados indicaron que no era posible un estudio transversal utilizando esta herramienta de análisis.

Para las plantas contaminadas con Cd, en el análisis longitudinal se observó que se acumula preferentemente en el cuello de la raíz en ambas especies. Al igual que en la experiencia con Cr, en hojas de *P. stratiotes* no se detectó Cd, encontrándose en cambio en *S. herzogii* como tercer elemento mayoritario, sin diferencias significativas entre ambas caras.

En el análisis transversal en *P. stratiotes*, se observó que el Cd se acumula en mayor proporción en la superficie de la raíz disminuyendo su concentración hacia el centro. En cambio, en *S. herzogii*, la mayor acumulación de Cd se encuentra en la pared de la médula (centro de la raíz), disminuyendo su concentración hacia la superficie de la raíz. MacFarlane y Burchett (2000) estudiaron la distribución celular y tisular de Cu, Pb y Zn en *Avicennia marina*, utilizando microscopía electrónica de barrido con microanálisis de rayos X, encontrando que la epidermis de la raíz actúa como barrera para el transporte de Pb, mientras que no ocurre lo mismo para Zn y Cu donde se encontraron similares concentraciones relativas desde la epidermis hasta la pared del cortex.

Tabla 12.1.. Distribución porcentual peso en peso (%p/p) de los diferentes elementos químicos encontrados en las distintas zonas estudiadas de *P. stratiotes* (Referencia, expuestas a Cr y expuestas a Cd). (a) cara adaxial. (b) cara abaxial.

Muestra	Zona	Na	Mg	Al	P	S	Cl	Cd	K	Ca	Cr	Mn	Fe
<i>P. stratiotes</i> Referencia	Hoja (a)		7			1	29		53	10			
	Hoja (b)	3	4			1	24		21	47			
	Ápice		4	18	2	2	5		5	52			12
	Medio	2	5	8		3	19		48	7			8
	Cuello		6	10		6	23		41	6		2	6
<i>P. stratiotes</i> Cr (III)	Hoja (a)						20		50	30	<1		
	Hoja (b)						24		54	22	<1		
	Ápice		5	20	3	5	10		15	8	23	2	10
	Medio	3	7	8	3	6	17		18	7	24	1	6
	Cuello	4	4	12	4	8	5		34	3	10	4	16
	Precipitado			4			4		17		45	9	21
<i>P. stratiotes</i> Cr (VI)	Ápice			13	4	6	28		16		4	9	20
	Medio	1	5	12	7	10	24		9	1	1	3	27
	Cuello		5	10	6	7	34		10	1	2	6	19
<i>P. stratiotes</i> Cr (III)	P. médula		2	5	3	5	29		21	10	9	4	12
	Córtex			1		1	25		26	11	14	8	14
	Superficie		4	16	1	3	10		17	3	28	1	17
<i>P. stratiotes</i> Cd	Hoja (a)		2	1		2	32	<1	47	16			
	Hoja (b)		1	1			36	<1	45	17			
	Ápice		3	16		2	10	11	16	2		13	25
	Medio		4	18		4	10	20	24	1		4	14
	Cuello	2	6	8		10	6	25	22	6		4	11
<i>P. stratiotes</i> Cd	P. médula	3	5		1	11	1	11	42	26			
	Córtex		1	16		7	5	18	24	9		5	15
	Superficie		2	14	2	3	14	33	15	7		3	7

Vesk y Allaway (1999) estudiaron la localización de metales en raíces de *E. crassipes* en un wetland urbano, determinando que el Fe se presentó en altos niveles en la superficie de la raíz, decreciendo su concentración centrípetamente, coincidiendo con nuestros

resultados para el caso del Cr. Por otra parte informaron que metales como Cu, Zn y Pb, a diferencia del Fe, no se localizaron en la superficie de la raíz, aumentando su concentración hacia el centro de la raíz. Wójcik et al. (2005), quienes estudiaron la localización del Cd en *Thlaspi caerulescens*, informaron la presencia de Cd en el parénquima cortical, endodermis y vasos xilemáticos de las raíces.

Tabla 12.2.: Distribución porcentual peso en peso (%p/p) de los diferentes elementos químicos encontrados en las distintas zonas estudiadas de *S. herzogii* (Referencia, expuestas a Cr y expuestas a Cd). (a) cara adaxial. (b) cara abaxial.

Muestra	Zona	Na	Mg	Al	P	S	Cl	Cd	K	Ca	Cr	Mn	Fe
<i>S. herzogii</i> Referencia	Hoja (a)	4		1		1	33		35	13			12
	Hoja (b)	2	2	1		2	35		35	20			2
	Ápice			3		3	22		54	16			2
	Medio		3	5		4	28		42	13			5
	Cuello		2		1	3	35		40	19			
<i>S. herzogii</i> Cr (III)	Hoja (a)			3			44		22	30	1		
	Hoja (b)			5			32		22	31	10		
	Ápice		4	3	2	6	19		26	13	24		3
	Medio		3	11	3	1	22		31	2	22		7
	Cuello	8	4	8	2	3	25		28	6	12		4
<i>S. herzogii</i> Cr (VI)	Ápice		3	15	3	14	16		24	1	1	3	20
	Medio	1	3	7	2	28	20		24		2	1	12
	Cuello	1	1	8	1	30	27		16	1	1	2	12
<i>S. herzogii</i> Cr (III)	P. médula			1			62		36	1	< 1		
	Córtex		2	17			15		35	3	8	2	18
	Superficie	3	3	3		5	24		33	10	15	1	3
<i>S. herzogii</i> Cd	Hoja (a)			1	2	2	35	14	40	6			
	Hoja (b)	8		2	3	2	30	13	35	7			
	Ápice					13	13	17	3	41		5	8
	Medio			16		2	4	50	8	4		4	12
	Cuello			13		1	4	50	8	5		4	15
<i>S. herzogii</i> Cd	P. médula			2		3	6	71	5	10		2	1
	Córtex	3	3	5	1	3	5	64	4	8		2	2
	Superficie			19		3	4	38	10	6		3	16

12.3 CONCLUSIONES

- En ambas especies cuando el Cr fue suministrado como Cr(III) se acumuló en mayor proporción en la superficie de la raíz. Un análisis longitudinal demostró que el Cr se acumula preferentemente en el extremo o ápice de la raíz, zona constituida por raíces nuevas, finas y por lo tanto de mayor metabolismo, mayor área superficial y mayor número de sitios de adsorción.
- En hojas de *P. stratiotes* no se detectó Cr través de la metodología empleada, mientras que el análisis en hojas de *S. herzogii* demostró mayor acumulación de este metal en la cara abaxial, lo que permitiría proponer que la presencia de Cr en hojas de *S. herzogii* se debe principalmente a la sorción por contacto directo de las hojas probablemente debido a la disposición de las mismas en contacto con la superficie el agua.
- Se observaron e identificaron precipitados de Cr sobre las raíces de *P. stratiotes* (cuando el Cr se agregó como Cr (III)), probablemente inducidos por exudados radiculares de esta especie.
- Debido a la baja concentración suministrada a causa de su toxicidad, no se obtuvieron resultados que permitieran alcanzar conclusiones cuando el Cr fue agregado como Cr (VI).
- En el análisis longitudinal se observó que el Cd se acumuló preferentemente en el cuello de las raíces de ambas especies, mientras que el análisis transversal indicó que para *S. herzogii* el Cd se acumuló en mayor proporción en la zona cercana a la

médula y para *P. stratiotes* en la superficie de la raíz, indicando que cada una de las especies estudiadas utiliza diferentes mecanismos de sorción de Cd.

- En hojas de *P. stratiotes* no se detectó Cd, detectándose en *S. herzogii*, sin diferencias significativas entre ambas caras. Lo que indica que el Cd en hojas se debe fundamentalmente a la translocación desde las raíces.

13. MODELO CINÉTICO PARA LA SORCIÓN DE Cd, Cr(III) Y Cr(VI)

POR *P. stratiotes* y *S. herzogii*

13.1. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA

La cinética no lineal de desaparición del metal de la solución observada en todo el rango de concentraciones estudiadas, para los dos metales y para las dos especies de plantas, sugiere que las plantas utilizan varios mecanismos para la remoción de los metales. Se debe remarcar que a pesar de las diferentes concentraciones de Cr(III) o Cd en agua, los porcentajes de remoción fueron similares y en ningún caso se alcanzó el 100 % de remoción. Podría inferirse que la sorción de Cr(III) y Cd es probablemente un mecanismo competitivo – consecutivo con pasos de reacción reversibles. Los datos de concentración de metal en agua de las experiencias de bioacumulación se ajustaron siguiendo la siguiente ecuación, la cual podría corresponder a este tipo de mecanismo.

$$C_w - C_{0w} = A_w(1 - e^{-t/r}) + B_w(1 - e^{-t/s}) \quad (1)$$

En la cual:

C_{0w} : concentración inicial de metal en agua.

C_w : concentración del metal en agua al tiempo t .

t : tiempo.

A_w , B_w , R y S : constantes empíricas.

Se utilizó el software Origin para ajustar los datos y obtener el valor de las constantes empíricas. (Tabla 8-a)

13.2. RESULTADOS Y DISCUSION

La mayoría de los autores que trabajaron en el tema (Prakash et al 1987, Kamal et al, 2004) ajustaron sus datos a diferentes relaciones matemáticas empíricas para encontrar la velocidad de remoción de metales del agua. Ding et al. (1994) utilizaron el método descrito por Hamelink (1977) que es un modelo simple de dos compartimentos (agua y plantas) con reacciones reversibles, similar al que proponemos, para simular la cinética de sorción de Cd por *E. crassipes* con la diferencia de que estos autores mantuvieron constante la concentración de Cd simplificándose el modelo.

Tabla 13.1.: Constantes empíricas de la ecuación (1) obtenidas para las dos plantas y las distintas concentraciones estudiadas de Cr(III) y Cd.

Metal	Especie	C _{0w}	A _w	B _w	R	S	r ²
Cr(III)	<i>S. herzogii</i>	1	-0,5695	-0,2361	0,09652	3,5183	0,9813
		2	-1,3149	-0,3843	0,07054	15,2708	0,9986
		4	-3,0022	-0,4017	0,05655	17,2807	0,9966
		6	-4,3448	-1,1111	0,03283	34,8675	0,9991
	<i>P. stratiotes</i>	1	-0,5317	-0,3503	0,06026	5,68832	0,9903
		2	-1,0660	-0,8197	0,02724	6,04911	0,9956
		4	-2,4749	-1,3552	0,03415	10,1471	0,9940
		6	-4,7005	-1,8848	0,02357	21,8673	0,9992
Cd	<i>S. herzogii</i>	1	-0,4589	-0,4547	0,02948	2,08226	0,9838
		2	-1,1241	-0,7196	0,05652	5,91008	0,9741
		4	-1,9906	-1,5188	0,70710	4,74175	0,9937
		6	-2,2255	-2,8949	0,05506	4,01632	0,9836
	<i>P. stratiotes</i>	1	-0,3471	-0,3810	0,05357	6,80603	0,9816
		2	-0,5175	-0,7798	0,02330	8,03050	0,9891
		4	-2,5424	-0,8653	0,03607	2,46448	0,9933
		6	-4,3359	-0,8630	0,02784	5,22010	0,9842

Representado en forma separada ambos términos de la ecuación (1) en función del tiempo para concentración, cada metal y cada especie (Figuras 13.1 a 13.4) se puede

proponer que la remoción de Cd y Cr(III) involucra dos procesos o componentes: uno rápido y uno lento. El componente rápido, prácticamente instantáneo, se produce durante los primeros minutos de contacto. La rapidez de la sorción podría sugerir que la sorción física o adsorción (fijación a las cargas negativas de la pared celular) es un importante mecanismo de remoción. Esta etapa rápida podría también incluir procesos de sorción química (absorción) como quelación (Dushenkov et al., 1995, Schneider y Rubio, 1999) e intercambio iónico (Lyon et al., 1969(b)).

La precipitación inducida por las raíces y procesos biológicos como la toma intracelular (transporte a través del plasmalema a las células interiores) son probablemente los responsables del componente más lento de la remoción del metal de la solución.

En *S. herzogii* la etapa rápida de sorción de Cd, presenta un valor límite, probablemente debido a que se saturan los sitios de adsorción. Este fenómeno no se observa en *P. stratiotes*, donde a mayor concentración de Cd en agua, se produce mayor sorción de Cd por etapa rápida. Esto puede deberse a que el área superficial, y por lo tanto los sitios de adsorción, de raíces de *S. herzogii* es menor que la de *P. stratiotes* (2,8 y 4,9 m² g⁻¹ respectivamente, como se determinó anteriormente). El comportamiento contrario ocurre con el componente lento. En *P. stratiotes* la sorción de Cd en esta etapa lenta llega a un máximo de 1 mg, independientemente de la concentración de Cd inicial en agua, mientras que en *S. herzogii* a mayor concentración de Cd inicial, mayor remoción por este mecanismo lento, llegando a ser a la concentración de 6 mg l⁻¹ de Cd inicial, mayor la sorción por esta etapa que la sorción producida en la etapa rápida al final de la experiencia (31 días de exposición). Estos resultados coinciden con lo hallado en Espectroscopía de Rayos X donde se observó mayor abundancia relativa de Cd en el interior de la raíz de *S. herzogii* y mayor abundancia relativa de Cd en la superficie de la raíz de *P. stratiotes*.

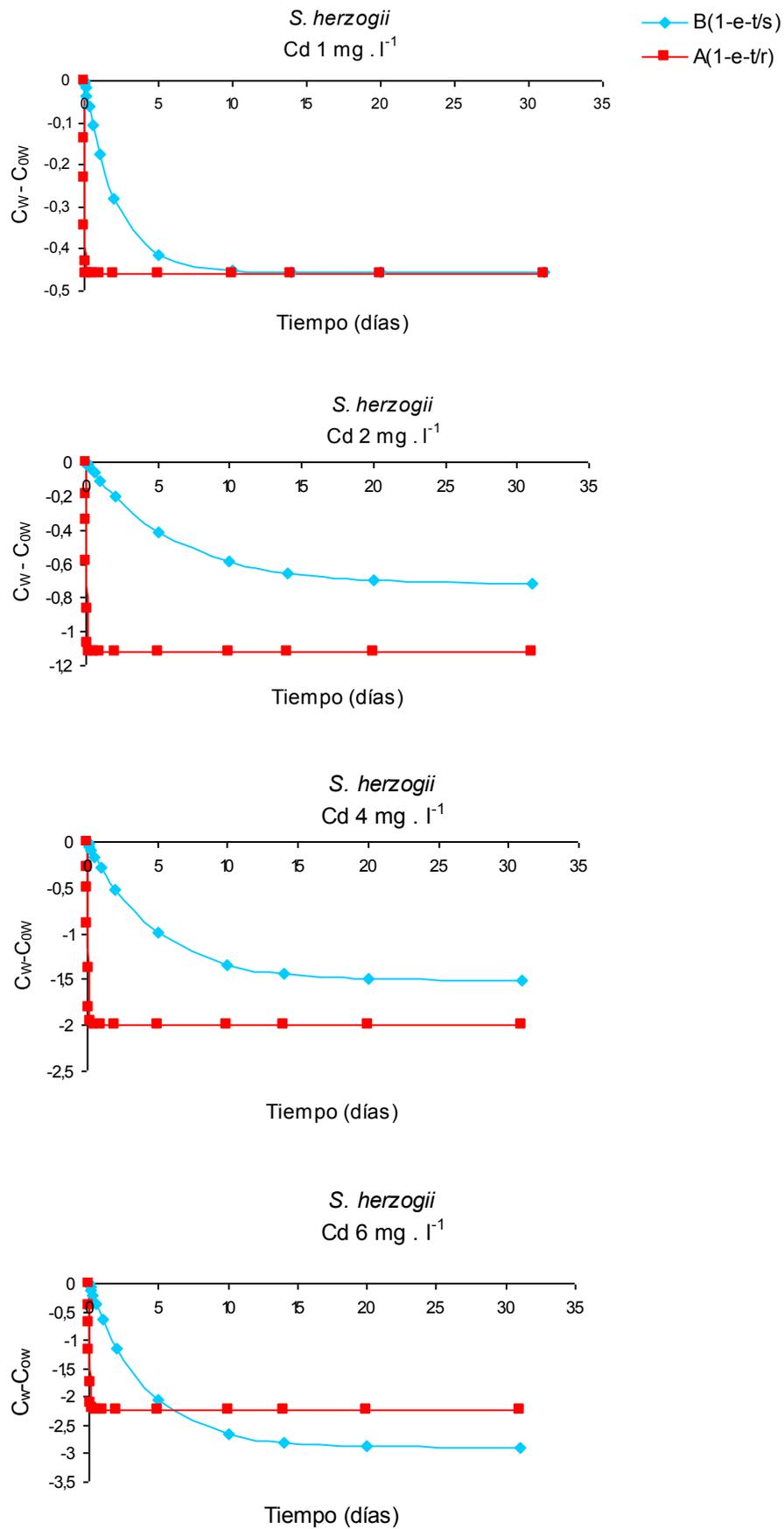


Figura 13.1.: Etapas lenta ($B_w(1-e^{-t/s})$) y rápida ($A_w(1-e^{-t/r})$) de sorción de Cd por *S. herzogii*. Se grafica $C_w - C_{0w}$ en función del tiempo.

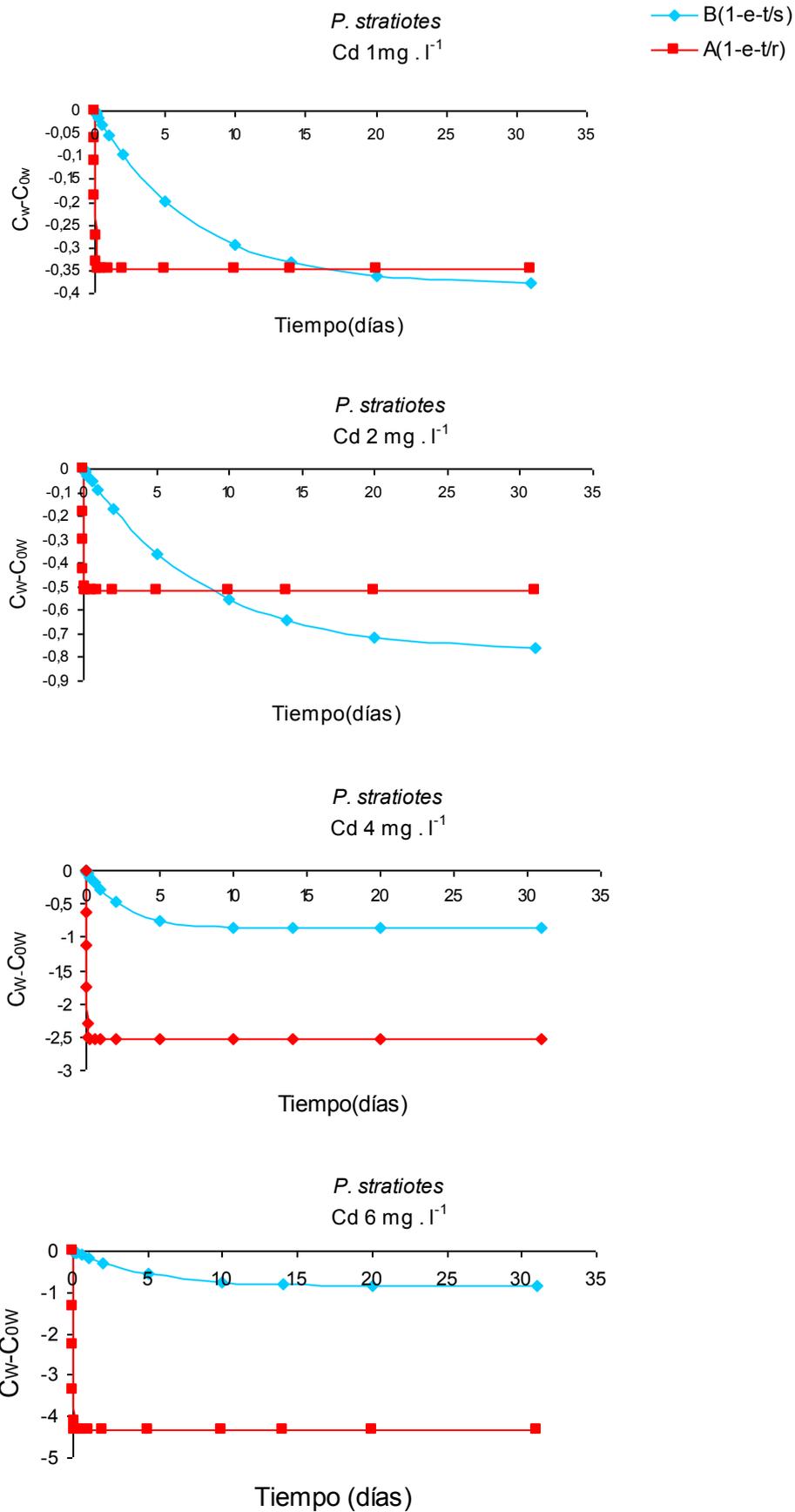


Figura 13.2.: Etapas lenta ($B_w(1-e^{-t/s})$) y rápida ($A_w(1-e^{-t/r})$) de sorción de Cd por *P. stratiotes*. Se grafica $C_w - C_{0w}$ en función del tiempo.

En lo que respecta al componente rápido de la sorción de Cr, no se observan diferencias significativas entre las especies, y es el responsable de la mayor disminución de Cr, especialmente a altas concentraciones. En cambio, el componente lento presenta diferencias entre ambas especies, para *P. stratiotes* es el responsable de una mayor remoción de Cr que en *S. herzogii* a todas las concentraciones estudiadas. Esto podría deberse al hecho de que la precipitación química inducida por raíces es uno de los mecanismos lentos de la remoción de Cr para *P. stratiotes*, como pudimos ver en el capítulo 12.

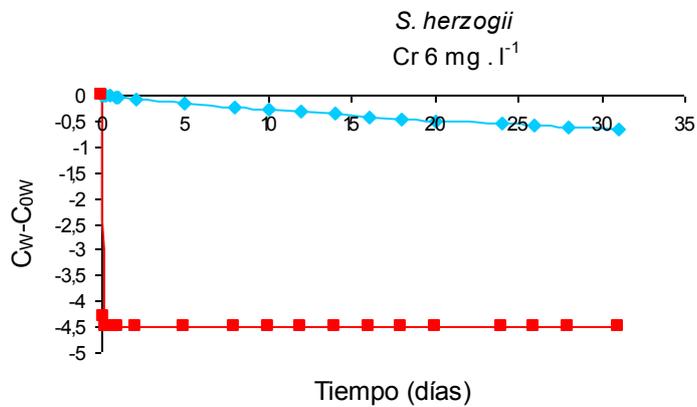
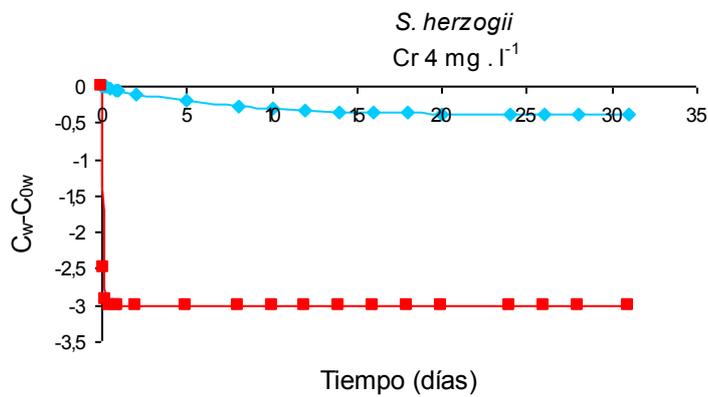
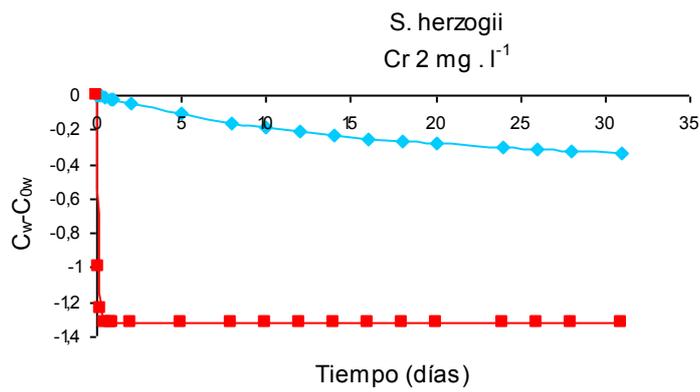
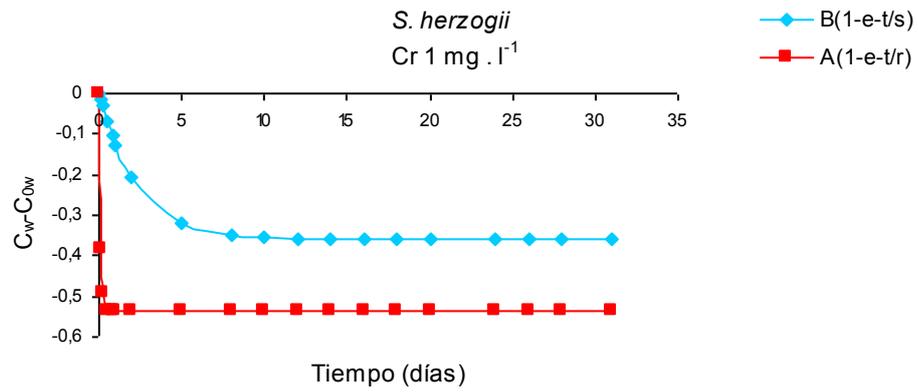


Figura 13.3.: .: Etapas lenta ($B_W(1-e^{-t/s})$) y rápida ($A_W(1-e^{-t/r})$) de sorción de Cr por *S. herzogii*. Se grafica $C_W - C_{0W}$ en función del tiempo.

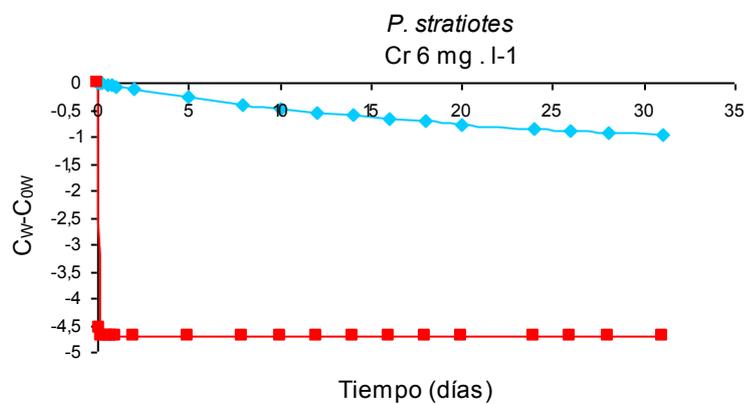
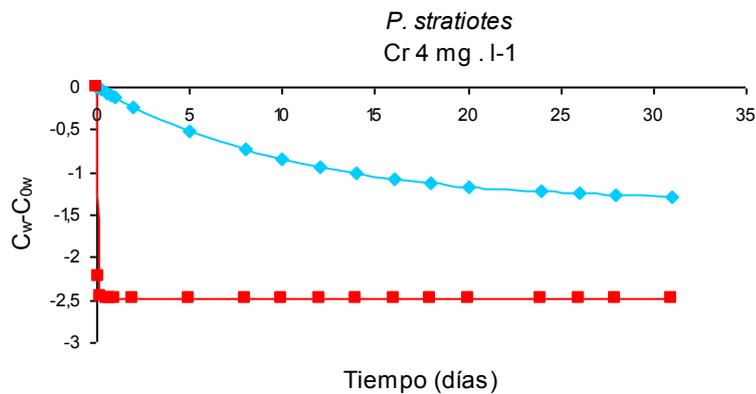
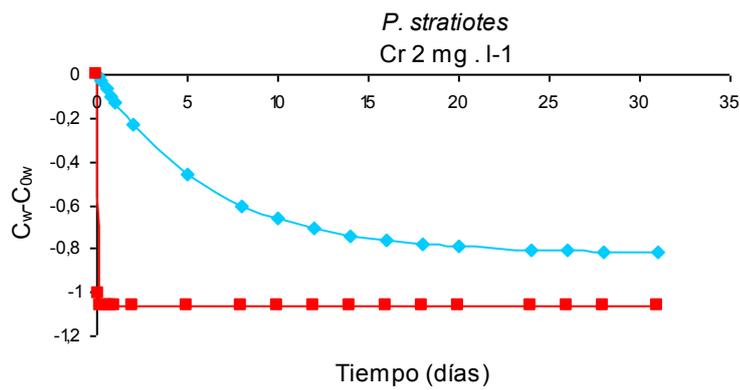
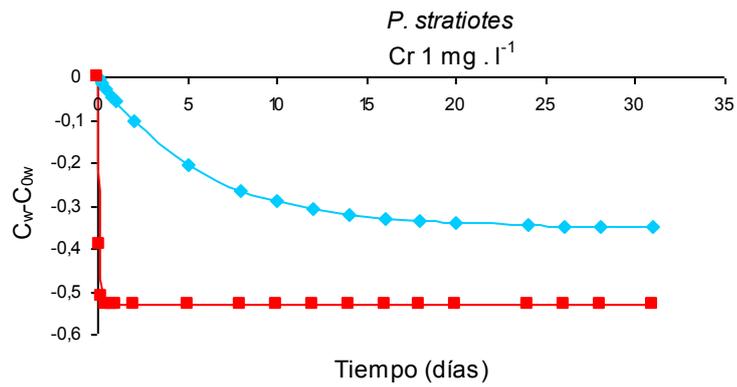


Figura 13.4.: Etapas lenta ($B_w(1-e^{-t/s})$) y rápida ($A_w(1-e^{-t/r})$) de sorción de Cr por *P. stratiotes*. Se grafica $C_w - C_{0w}$ en función del tiempo.

Si comparamos ahora, cada uno de los metales en *S. herzogii*, podemos observar que esta especie acumula mucho más Cr que Cd por etapa rápida, principalmente a las mayores concentraciones, mientras que por el contrario, la acumulación de Cd por etapa lenta es mayor que la acumulación de Cr.

En el caso de *P. stratiotes*, la cantidad de Cr y de Cd sorbido por etapa rápida fueron similares. Lo mismo ocurrió en la etapa lenta.

A fin de comparar los mecanismos de remoción para Cr (III) y Cr (VI), se ajustaron los datos de concentración de Cr (VI) (2 y 6 mg l⁻¹) en agua en función del tiempo a la ecuación propuesta para la sorción de Cr(III) y Cd.

Al igual que en los casos anteriores se representaron por separado ambos términos de la ecuación (1) en función del tiempo para cada especie y para cada concentración (Fig. 13.5). Se puede observar que la remoción de Cr(VI) de la solución involucra un único proceso, el lento, probablemente debido a la falta del fenómeno de adsorción ($A_w = 0$ en todos los casos). El proceso lento podría deberse a la toma intracelular (transporte a través del plasmalema dentro de la célula) y mecanismos de detoxificación. Este proceso presenta diferencias entre ambas especies, siendo mayor la remoción en *S. herzogii*. Si bien se evidenciaron síntomas de toxicidad en ambas especies, la más afectada por Cr(VI) fue *P. stratiotes* a las dos concentraciones estudiadas.

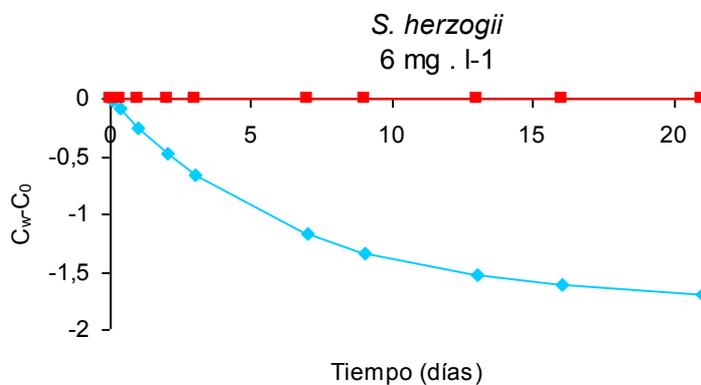
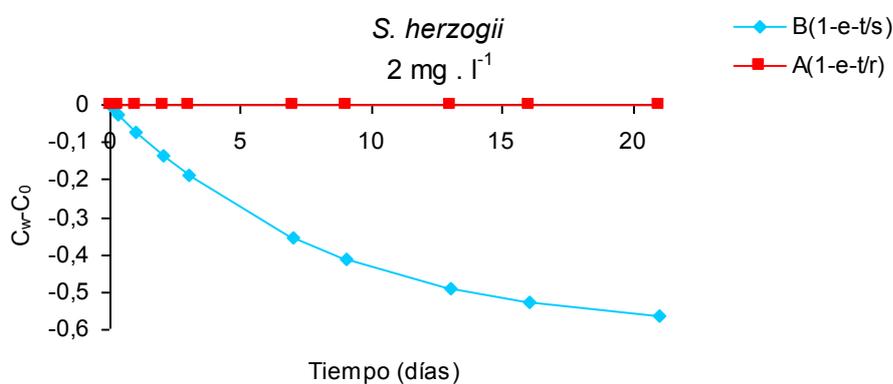
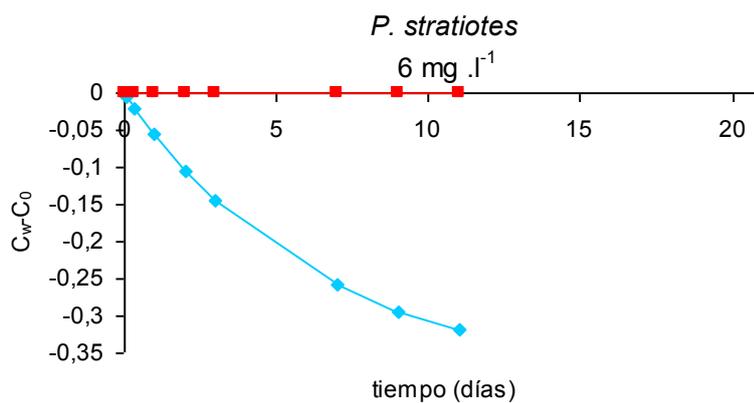
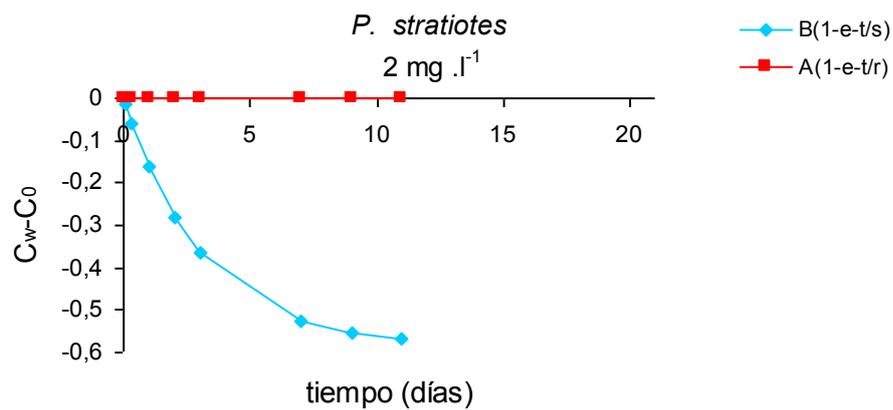


Figura 13.5.: Etapas lenta ($B_w(1-e^{-t/s})$) y rápida ($A_w(1-e^{-t/r})$) de sorción de Cr (VI) por *P. stratiotes* y *S. herzogii*. Se grafica $C_w - C_{0w}$ en función del tiempo.

13.3. CONCLUSIONES

- La sorción de Cd por la etapa rápida en *S. herzogii* presenta un valor límite, probablemente debido a que se saturan los sitios de adsorción. El valor límite para *P. stratiotes* parece no haberse alcanzado a las concentraciones estudiadas (a mayor concentración de Cd en agua, se produce mayor sorción de Cd por etapa rápida). Esto puede deberse a las diferencias en el área superficial de las raíces (y por lo tanto los sitios de adsorción), siendo de $2,8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para *S. herzogii* y $4,9 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para *P. stratiotes*.

- La sorción de Cd por mecanismo lento es diferente para las dos especies estudiadas. En *P. stratiotes* se alcanza un máximo, independientemente de la concentración de Cd inicial en agua, mientras que en *S. herzogii* a mayor concentración de Cd inicial, mayor remoción por este mecanismo lento. Cuando la concentración inicial de Cd fue de 6 mg l^{-1} la sorción por mecanismo lento fue, al final de la experiencia (31 días de exposición), superior a la sorción producida en la etapa rápida.

- El mecanismo rápido es el responsable de la mayor remoción de Cr (III), especialmente a altas concentraciones, no observándose diferencias significativas entre las especies.

- La remoción de Cr (III) mediante el componente lento es significativamente superior en *P. stratiotes* que en *S. herzogii* a todas las concentraciones estudiadas. Esto podría deberse a que la precipitación química inducida por raíces es uno de los mecanismos lentos de la remoción de Cr para *P. stratiotes*.

- *S. herzogii* acumula mayor cantidad de Cr que Cd mediante el mecanismo rápido, principalmente a las mayores concentraciones, y contrariamente, la acumulación de Cd por etapa lenta es mayor que la acumulación de Cr.

- En *P. stratiotes* no existieron diferencias significativas entre las cantidades de Cr y Cd sorbido por etapa rápida. Lo mismo ocurrió en la etapa lenta.

- La remoción de Cr(VI) de la solución involucra únicamente el proceso lento, probablemente debido a la falta del fenómeno de adsorción. El proceso lento podría deberse a la toma intracelular (transporte a través del plasmalema dentro de la célula) y mecanismos de detoxificación. Este proceso presenta diferencias entre ambas especies, siendo mayor la remoción en *S. herzogii*.

14. CASO DE APLICACIÓN: WETLAND EXPERIMENTAL PARA TRATAMIENTO DE UN EFLUENTE REAL DE INDUSTRIA METALÚRGICA.

14.1. INTRODUCCION

La empresa metalúrgica Bahco Argentina SA solicitó a nuestro grupo de trabajo evaluar la factibilidad de llevar a cabo el tratamiento de los efluentes de su planta industrial de la ciudad de Santo Tomé utilizando un humedal artificial diseñado con ese propósito. Los efluentes a tratar presentaban elevados valores de pH y conductividad y contenían Cr, Ni y Zn. Este trabajo representó la posibilidad de extrapolar a campo y en condiciones más desfavorables que las planteadas en laboratorio, la aplicación de esta tecnología.

Los humedales naturales y construidos son una nueva y promisoría tecnología para el tratamiento de aguas residuales que ha sido aceptada en la mayor parte del mundo. Los humedales naturales no están siempre disponibles en el lugar donde debe llevarse a cabo el tratamiento del agua y su utilización puede traer aparejado la contaminación de acuíferos ya que son sistemas abiertos. Los humedales artificiales pueden construirse donde se necesitan, dimensionarse de acuerdo a las necesidades del tratamiento, han demostrado ser altamente eficientes en la remoción de contaminantes, flexibles a fluctuaciones de la carga del contaminante y el caudal, son de bajo costo de instalación y de mantenimiento, son operables por mano de obra no especializada, integrables funcionalmente con el entorno y además ofrecen beneficios recreacionales y estéticos (Jenssen et al., 1993, De Luis Calabuig, 2001, Perdomo et al., 2001). El ambiente complejo e integrado de los humedales construidos provee un gran número de mecanismos para remover contaminantes de las aguas durante su pasaje a través de los mismos, estos incluyen procesos físico-químicos (adsorción, precipitación, sedimentación, etc.) y biológicos (transformación bacteriana y asimilación a través de la vegetación acuática) (Chang et.al. 1982, Jenssen et al, 1993,

Gersberg et. al., 1986). Las macrófitas son el principal componente biológico de estos ecosistemas ya que no sólo asimilan los contaminantes directamente en sus tejidos, sino que además 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 et al., 1993). Las plantas translocan oxígeno desde la parte aérea hasta las raíces, de esta manera la rizósfera ofrece un microambiente oxigenado que estimula la descomposición de materia orgánica y el crecimiento de bacterias. (Gersberg et al., 1986).

Esta tecnología ha sido implementada en países de climas tropicales y subtropicales para la depuración de efluentes cloacales y agrícolas. El sitio geográfico donde se construyó el humedal pertenece a la región central de la República Argentina, de clima templado, cercana al valle de inundación del Río Paraná Medio y al sistema del Río Salado, lo que garantiza una enorme disponibilidad de especies autóctonas adaptadas al clima. En la Argentina, a pesar de que existe una baja densidad de población y gran disponibilidad de terrenos marginales de bajo costo, que favorecerían la implementación, el desarrollo de esta metodología es prácticamente nula.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de un humedal construido a escala piloto en la remoción de contaminantes de un efluente de una industria metalúrgica.

14.2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

14.2.1. Diseño del humedal

El humedal piloto construido fue del tipo de flujo superficial. Las dimensiones del humedal son de 6 m de largo por 3 m de ancho (Fig.1). El humedal se impermeabilizó con un film de polietileno en el fondo para asegurar que los contaminantes no pasen a las

napas. Sobre este film se dispuso aproximadamente 30 cm de tierra del área de excavación donde se arraigaron las plantas emergentes.

El humedal recibió el efluente a través de un tubo de PVC de 63 mm de diámetro. En el extremo se colocó un tubo de distribución perpendicular de 90 mm de diámetro con orificios de 20 mm de diámetro, separados entre sí por una distancia de 15 cm para producir una entrada de agua de forma laminar, a fin de que el agua se distribuya amplia y uniformemente. Se instaló una válvula de cierre en el tubo de entrada antes de la cañería perpendicular de distribución. El efluente de salida abandonó el humedal a través de una compuerta de plástico con un corte en “V”. Dicho efluente fue conducido por un canal hacia una laguna de 3 ha que existe en el mismo predio.

El humedal se llenó con agua de red hasta lograr un nivel de aproximadamente 40 cm (inmediatamente después de haber trasplantado las especies arraigadas emergentes) y luego se agregó el efluente mezclado con agua de red. La proporción agua de red/efluente se disminuyó paulatinamente hasta llegar a agregar solamente efluente. El caudal del efluente que ingresó al humedal es de 1000 l/día y el tiempo de residencia hidráulico en el humedal se estimó en 7 días. El efluente recibe un tratamiento primario previo a su ingreso al humedal, los contaminantes primarios son Cr, Ni y Zn (componentes del efluente industrial) y P y N (provenientes del efluente cloacal y del industrial).

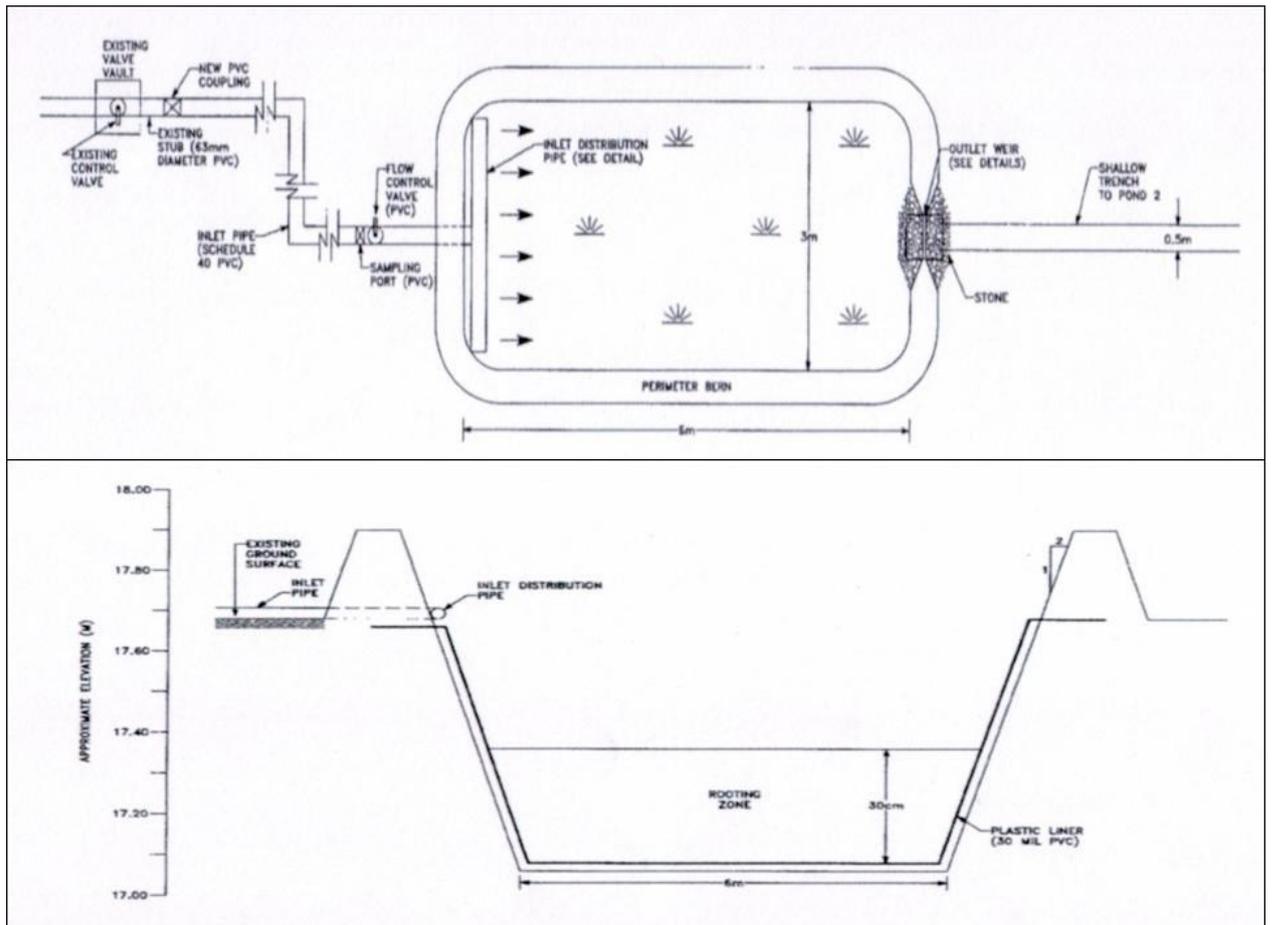


Figura 1: Esquema del humedal experimental

Las plantas que se utilizaron son especies arraigadas emergentes y flotantes libres autóctonas, transplantadas de ambientes naturales de la zona del valle aluvial del río Paraná Medio. Se utilizaron varias especies vegetales porque, en general, no se recomienda el monocultivo por considerarse más vulnerable a las enfermedades y ser sistemas de baja biodiversidad. Por otra parte esta experiencia representó la posibilidad de evaluar en condiciones reales la eficiencia y tolerancia de las distintas especies que se desarrollan en la zona, por lo que se decidió utilizar una importante variedad de ellas. *S. herzogii*, *P. stratiotes* y *E. crassipes*, son algunas de las especies flotantes libres que se utilizaron, a partir de resultados obtenidos en experiencias previas tanto en el curso de la presente tesis como así también en la bibliografía (Delgado et al., 1993, Maine et al., 1999, 2001).

Las especies emergentes, como por ejemplo *Cyperus alternifolius* L., *Typha* sp., *Scirpus* sp. y *Juncus* sp., *Paspalum repens*, se utilizaron teniendo en cuenta el criterio de que son eficientes en la acumulación de nutrientes y contaminantes en humedales naturales y construidos (Gersberg et al., 1986; Jenssen et al., 1993; Ellis et al., 1994). Estas últimas especies se podaron antes de su trasplante y se trasladaron evitando que se quiebren sus tallos y rizomas. La Tabla 14.1. lista las especies vegetales transplantadas al humedal.

Tabla 14.1.: Especies vegetales transplantadas al humedal piloto ordenadas por familia botánica:

#	Familia	Nombre científico	Nombre vulgar
1	Araceae	<i>Pistia stratiotes</i> L.	Repollito de agua
2	Bromeliaceae	<i>Aechmea distichantha</i> Lem.	Caraguatay
3	Cyperaceae	<i>Cyperus alternifolius</i> L.	Paragüita
4	Gramineae	<i>Panicum elephantipes</i> Ness. ex Trin.	Canutillo
5	Marantaceae	<i>Thalia geniculata</i> L.	Talia
6	Polygonaceae	<i>Polygonum punctatum</i> Elliott.	Catay dulce
7	Pontederiaceae	<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms.	Camalote
8		<i>Pontederia cordata</i> L.	Camalote, aguapey
9		<i>Pontederia rotundifolia</i> L. f.	Camalote
10	Salviniaceae	<i>Salvinia herzogii</i>	Helechito de agua
11	Typhaceae	<i>Typha dominguensis</i> Pers.	Totora

14.2.2. Descripción del estudio

Se estudió la eficiencia del humedal en la retención de los contaminantes del efluente a partir del estudio de la composición química del efluente de entrada y el de salida del humedal, desde julio de 2001 hasta setiembre de 2002. Se realizó además un estudio sistemático de las macrófitas y los sedimentos de fondo, en relación con la absorción de nutrientes (P) y metales pesados (Cr, Ni y Zn) en el humedal construido.

En el efluente de entrada y de salida al humedal se determinó semanalmente, durante los primeros cuatro meses de experiencia, luego quincenalmente y por último mensualmente, la concentración de PSR (fósforo soluble reactivo), P total, nitrato, nitrito, amonio, cromo, níquel, cinc, hierro, temperatura, pH, conductividad, color, turbidez, sólidos totales, dureza, cloruros, sulfatos, alcalinidad total, carbonatos, bicarbonatos, flúor, detergentes, oxígeno disuelto, demanda biológica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO).

En sedimentos se determinó inicialmente y mensualmente la concentración de P, NTK, Cr, Ni y Zn. Se muestrearon sedimentos en la zona de descarga del efluente y a la salida del humedal.

Las macrófitas se muestrearon inicialmente y mensualmente, separándose en parte aérea y sumergida, donde se determinó la concentración de P, Cr, Ni y Zn.

14.2.3. Análisis estadístico

Se determinó la eficiencia del humedal construido en la remoción de contaminantes mediante la comparación de medias de los parámetros de calidad de agua que se midieron en el efluente de entrada y salida (test de diferencia de medias).

Se determinó si las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas entre las concentraciones de PT, NTK, Cr, Ni y Zn que se midieron en el sedimento de la zona de entrada y de salida, utilizando ANOVA (factores: lugar de muestreo y tiempo). Para cada contaminante (P, Cr, Ni y Zn) se realizó un ANOVA de dos factores (especie y órgano vegetativo) para determinar si existieron diferencias significativas entre las concentraciones de los contaminantes de las distintas especies estudiadas y entre las de hojas y raíces.

Se utilizó el test de Duncan para diferenciar medias cuando se detectaron diferencias significativas. Se utilizó un nivel de $p < 0,05$ en todas las comparaciones. La normalidad de los residuales se estudió gráficamente. Se utilizó el test de Bartlett para homocedasticidad, para corroborar si las variancias fueron homogéneas (Walpole y Myers., 1999).

Para monitorear el funcionamiento del wetland se realizó un análisis multivariado.

Los cálculos se efectuaron utilizando el software Statgraphics Plus 3.0.

14.3. RESULTADOS

14.3.1. Agua

La Tabla 14.2. muestra los valores medios, mínimos y máximos y los porcentajes de remoción de las variables medidas en el efluente de entrada y salida del humedal. Las concentraciones de los diferentes parámetros medidos fueron significativamente mayores en el efluente de entrada que en el efluente de salida del humedal, excepto para el bicarbonato y el amonio. En la mayoría de los muestreos, la temperatura del agua en el humedal se encontró entre 13°C y 26°C, alcanzando una mínima de 11°C en un único muestreo, mientras que en ambientes naturales osciló entre 9°C y 10°C desde mayo a julio. Las concentraciones de OD mostraron grandes variaciones a la entrada, siendo la concentración media de 6,6 mg l⁻¹. En el efluente de salida las concentraciones fueron inferiores, presentando un valor medio de 3,1 mg l⁻¹ (Tabla 14.2.). En dos muestreos, el efluente de entrada fue anóxico, mientras que en los mismos el efluente de salida del humedal alcanzó concentraciones de OD de 2 y 4 mg l⁻¹. El pH de entrada fue alcalino (8,0-12,5) y disminuyó en el efluente de salida obteniéndose valores que variaron en un rango comprendido entre 7,0 y 9,0. El sulfato y el Ca mostraron porcentajes de remoción

de 35% y 42%, respectivamente. Las concentraciones de nitrato y el nitrito disminuyeron en el efluente de salida alcanzando una remoción media de 89% y 92%, respectivamente. En el efluente de salida, la concentración de amonio disminuyó mientras el sistema permaneció aeróbico. HCO_3^- fue el único parámetro medido cuya concentración fue siempre superior a la salida respecto de de la entrada. Las concentraciones de carbonato disminuyeron en el efluente de salida, alcanzando un porcentaje de remoción de 91%. Un promedio de 32% de sólidos totales disueltos fueron retenidos en el humedal. El PT y el PRS alcanzaron porcentajes de retención de 70% y 77%, respectivamente. Entre los metales, la mayor retención fue registrada para el Fe (84%), seguida por la del Cr (82%), Ni (69%) y por último la del Zn (44%). Las concentraciones de Zn registradas en el efluente de salida del humedal fueron las más bajas y se encontraron frecuentemente por debajo del límite de detección del método. Siempre que ocurrieron altas concentraciones de Zn en el efluente de entrada, se registró una retención importante de este metal obteniéndose un rango de 25-81%. La DQO y DBO mostraron porcentajes de remoción de 79% y 76%, respectivamente.

Tabla 14.2.: Variables medidas y porcentajes de remoción en el humedal experimental.
(n=18)

Parámetro	Entrada			Salida			% Remoción		
	Media	Max.	Min.	Media	Max.	Min.	Media	Max	Min
Temperatura (°C)	18,4	26,0	11,0	18,4	26,0	11,0	----	----	----
Cond. (uS cm ⁻¹)	5130	8500	3300	3120	5400	750	----	----	----
O ₂ (mg l ⁻¹)	6,18	10,6	0,0	3,15	5,80	0,0	----	----	----
pH	10,1	12,5	8,03	7,98	9,03	7,03	19,5	39,2	4,40
Solidos (mg l ⁻¹)	4180	8050	2350	2690	4260	610	33,0	92,4	1,23
HCO ₃ ⁻ (mg l ⁻¹)	218	615	0,0	399	713	203	-----	-----	-----
CO ₃ ²⁻ (mg l ⁻¹)	97,1	403	0,0	10,5	48,4	0,0	91,3	100	72,2
Cl ⁻ (mg l ⁻¹)	752	1840	387	500	875	70	31,6	86,4	4,54
SO ₄ ²⁻ (mg l ⁻¹)	1440	2320	298	929	1620	204	35,2	72,6	0,0
Ca ²⁺ (mg l ⁻¹)	171	292	43,2	97	238	22,3	40,5	79,3	0,982
Mg ²⁺ (mg l ⁻¹)	25,2	95,9	0,0	11,1	19,3	4,5	38,6	85,5	0,0
Na ⁺ (mg l ⁻¹)	1070	1710	544	781	1280	180	26,6	66,9	0,0
K ⁺ (mg l ⁻¹)	20,6	24,7	12,8	18,0	23,0	11,6	12,9	35,8	0,0
PSR (mg l ⁻¹)	0,549	2,56	0,026	0,141	0,572	0,010	75,0	98,4	0,0
P total (mg l ⁻¹)	0,972	4,66	0,082	0,228	0,689	0,025	73,6	97,8	0,0
N-NO ₃ ⁻ (mg l ⁻¹)	20,3	86,1	4,93	1,52	3,98	0,214	88,1	97,6	54,1
N-NO ₂ ⁻ (mg l ⁻¹)	2,25	12,0	0,027	0,150	0,890	0,001	84,9	99,8	53,0
N-NH ₄ ⁺ (mg l ⁻¹)	2,21	4,86	0,320	2,25	9,55	0,006	36,3	99,4	0,0
Inorg-N (mg l ⁻¹)	24,8	95,1	9,54	3,91	14,4	0,310	79,1	96,8	24,8
Fe (mg l ⁻¹)	9,09	32,0	0,053	0,212	0,7	0,048	81,7	99,8	9,10
Cr (mg l ⁻¹)	0,127	0,589	0,005	0,013	0,105	0,001	81,1	99,8	23,5
Ni (mg l ⁻¹)	0,181	0,750	0,003	0,051	0,190	0,004	66,1	96,2	18,2
Zn (mg l ⁻¹)	0,060	0,210	0,04	0,040	0,069	0,010	59,0	81,0	0,0
DQO (mg l ⁻¹)	276	583	57	40	85	22	78,4	94,7	7,18
DBO (mg l ⁻¹)	136	400	17	15	38	2	78,2	98,8	52,9

Para monitorear el funcionamiento del humedal se realizó una carta de control multivariado, utilizando previamente un análisis multivariado, a través de componentes principales. Los resultados fueron satisfactorios ya que no se pudo rechazar la hipótesis de que el proceso estuvo en un estado de control estadístico con un nivel de confianza del 95 %, y además no se pudo rechazar la hipótesis de que el proceso pudo explicarse considerando únicamente los tres primeros componentes principales, con un nivel de confianza del 95 %. (ANEXO IV). Es interesante resaltar que en este análisis estadístico para el efluente de entrada se observa que la reducción de datos es menor que para el efluente de salida. Esto puede deberse a la gran variabilidad que posee el efluente que ingresa al humedal. Satisfactoriamente se puede observar que la variabilidad es menor en el efluente de salida, pudiendo interpretarse el comportamiento del wetland tomando en cuenta solamente los tres primeros componentes principales.

14.3.2 Sedimentos

Las concentraciones de Cr, Ni y Zn aumentaron durante el periodo estudiado, siendo significativamente mayores que las concentraciones iniciales después de un año de estudio tanto en las zonas de entrada como en la de salida del humedal (Tabla 14.3.). Si comparamos las concentraciones del sedimento de la zona de entrada se observa que fueron significativamente mayores que las de la salida. En cuanto a los nutrientes, la concentración final de PT y de materia orgánica a la entrada del humedal fue significativamente mayor que la inicial, mientras que estas concentraciones a la salida y las concentraciones de NTK tanto a la entrada como a la salida no mostraron variaciones significativas. (Tabla 14.4.).

Tabla 14.3.: Concentraciones de Cr, Ni y Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$) en los sedimentos del wetland experimental al comienzo y final de la experiencia.

		Inicial	Oct. 2001	Nov. 2001	Dic. 2001	Feb. 2002	Set. 2002
		Ago. 2001					Final
Cr	Entrada	6,3	8,0	25	50	100	239
	Salida	6,3	6,5	26	45	35	96
Ni	Entrada	5,2	6,7	27	55	74	149
	Salida	5,2	5,3	59	72	46	65
Zn	Entrada	30,3	34,3	97	216	178	189
	Salida	30,3	30,5	42	43	72	75

Tabla 14.4.: Concentraciones medias iniciales y finales de materia orgánica, NTK y P en el sedimento del humedal construido a escala reducida.

Variables	Inicial	Final	
		Entrada	Salida
Materia orgánica (%)	7,5	8,9	7,8
NTK (mg g^{-1} p. s.)	0,33	0,37	0,32
PT (mg g^{-1} p. s.)	0,45	0,78	0,38

14.3.3. Vegetación

14.3.3.1. Cobertura vegetal

P. stratiotes presentó un desarrollo inicial alcanzando un 40% de cobertura del humedal experimental en noviembre de 2001. Todas las especies flotantes sufrieron una disminución en su cobertura en los sucesivos muestreos hasta desaparecer del humedal. *S. herzogii* desapareció en noviembre de 2001, *E. crassipes* en diciembre de 2001 y *P. stratiotes* en marzo de 2002. Las especies emergentes mostraron buen crecimiento inicial. Sin embargo, a fines de agosto de 2001, *P. cordata*, *P. rotundifolia* y *T. geniculata*

comenzaron a decaer en su crecimiento y desaparecieron del humedal en septiembre de 2001. *C. alternifolius* y *P. punctatum* mostraron síntomas de estrés a fines de septiembre y desaparecieron en octubre de 2001. Todas estas especies alcanzaron como máximo una cobertura menor a 5%. Sólo las macrófitas emergentes *P. elephantipes* y *T. domingensis* permanecieron en el humedal. La primera alcanzó la máxima cobertura en marzo de 2002 y luego disminuyó hasta la desaparición casi total de sus partes emergentes al final del estudio, quedando representada esta especie mayormente por sus partes sumergidas. Al final del período de estudio, *T. domingensis* aumentó su cobertura y se convirtió en la especie dominante del humedal, ocupando aproximadamente el 70% del mismo.

14.3.3.2. Concentraciones de metales en la vegetación

Las Tablas 14.5., 14.6. y 14.7. muestran las concentraciones de Cr, Ni y Zn respectivamente en tejido vegetal a los diferentes tiempos muestreados.

Se observó un aumento significativo en la concentración de metales en la biomasa, en relación con la concentración inicial, en todas las especies. Las concentraciones de metales fueron significativamente superiores en las raíces en comparación con las concentraciones en las hojas.

Tabla 14.5.: Concentración de Cr en plantas ($\mu\text{g g}^{-1}$) en el wetland piloto. (a parte aérea y b parte sumergida)

Cr	Jul. 01	Ag.01	Set. 01	Oct.01	Nov.01	Feb.02	Set. 02
<i>E. crassipes</i> (a)	0,2	0,7	12,4	27,1			
<i>E. crassipes</i> (b)	0,8	1,1	20,4	101,6			
<i>S. herzogii</i> (a)	0,1	1,0	7,4	21,9			
<i>S. herzogii</i> (b)	0,2	2,0	20,7	57,9			
<i>P. stratiotes</i> (a)	0,1	1,8	6,3	24,1	21,4		
<i>P. stratiotes</i> (b)	0,9	1,5	11,9	55,1	39,2		
<i>C. alternifolius</i> (a)	0,1	0,8	15,8	11,3	28,0		
<i>C. alternifolius</i> (a)	0,2				26,5		
<i>P. cordata</i> (a)	1,0	1,6	5,7	15,0	20,2		
<i>P. cordata</i> (b)	1,2				20,9		
<i>P. elephantipes</i> (a)	8,8				10,8	24,4	128,8
<i>P. elephantipes</i> (b)	11,2				55,6		318,1
<i>T. domingensis</i> (a)	0,1	0,4	4,8	11,1	19,8	18,3	35,8
<i>T. domingensis</i> (b)	0,2				24,0		109,5

Tabla 14.6.: Concentración de Ni en plantas ($\mu\text{g g}^{-1}$) en el wetland piloto. (a parte aérea y b parte sumergida)

Ni	Jul. 01	Ag.01	Set. 01	Oct.01	Nov.01	Feb.02	Set. 02
<i>E. crassipes</i> (a)	1,2	2,6	6,6	93,2			
<i>E. crassipes</i> (b)	9,2	19,7	18,0	130,2			
<i>S. herzogii</i> (a)	1,2	4,5	4,8	50,0			
<i>S. herzogii</i> (b)	6,5	18,9	20,3	119,9			
<i>P. stratiotes</i> (a)	1,9	3,6	4,7	5,5	53,7		
<i>P. stratiotes</i> (b)	10,1	18,2	16,4	167,4	212,0		
<i>C. alternifolius</i> (a)	1,4	3,4	3,2	25,8	25,7		
<i>C. alternifolius</i> (b)	10,2				11,5		
<i>P. cordata</i> (a)	3,1	5,2	2,4	3,1	3,3		
<i>P. cordata</i> (b)	7,6				9,1		
<i>P. elephantipes</i> (a)	1,1				1,1	14,7	66,4
<i>P. elephantipes</i> (b)	10,0				32,2		169,4
<i>T. domingensis</i> (a)	1,1	2,1	4,8	18,9	14,6	14,4	32,0
<i>T. domingensis</i> (b)	1,3				39,8		70,0

Tabla 14.7.: Concentración de Zn en plantas ($\mu\text{g g}^{-1}$) en el wetland piloto. (a parte aérea y b parte sumergida)

Zn	Jul. 01	Ag.01	Set. 01	Oct.01	Nov.01	Feb.02	Set. 02
<i>E. crassipes</i> (a)	10,2	44,7	41,7	91,3			
<i>E. crassipes</i> (b)	1,1	6,5	64,7	182,9			
<i>S. herzogii</i> (a)	3,3	35,3	51,0	66,3			
<i>S. herzogii</i> (b)	12,8	55,3	77,2	122,8			
<i>P. stratiotes</i> (a)	10,3	41,3	70,4	105,8	748,9		
<i>P. stratiotes</i> (b)	25,9	57,2	55,9	185,1	971,1		
<i>C. alternifolius</i> (a)	12,5	22,9	30,7	46,7	97,9		
<i>C. alternifolius</i> (b)	24,5				74,0		
<i>P. cordata</i> (a)	22,5	26,0	30,8	22,1	20,8		
<i>P. cordata</i> (b)	60,8				331,2		
<i>P. elephantipes</i> (a)	23,2				84,6	34,2	40,6
<i>P. elephantipes</i> (b)	41,6				35,9		70,7
<i>T. domingensis</i> (a)	6,1	15,7	24,3	22,7	21,8	23,1	38,7
<i>T. domingensis</i> (b)	56,7				45,5		66,7

Comparando las concentraciones de metales en raíces de las especies flotantes en el muestreo previo a su desaparición, *E. crassipes* mostró la mayor concentración de Cr, mientras que *P. stratiotes* mostró la mayor concentración de Ni y Zn.

14.4. DISCUSIÓN

El humedal resultó eficiente en la remoción de nutrientes y metales, reduciendo su concentración y también su variabilidad a la salida del mismo. La composición del efluente de salida del humedal se vio poco afectada por la alta variabilidad del efluente de entrada.

Las concentraciones de OD fueron frecuentemente inferiores en el efluente de salida respecto del efluente de entrada al humedal.

Los altos porcentajes medios de reducción de DQO y DBO demostraron la mineralización de la materia orgánica en el humedal. El nitrato y el nitrito fueron satisfactoriamente removidos por el humedal, en cambio el amonio presentó una remoción

media menor. Debido a que la concentración de nitrato es mucho mayor que la de amonio en el efluente que ingresa al humedal, el balance de N inorgánico total presenta una importante reducción neta del 79 % del N inorgánico total. Debido a la falta de oxígeno, se sugiere que la desnitrificación representa el principal proceso de remoción de nitrato y nitrito.

Si bien el wetland fue eficiente en la retención de PRS, entre la séptima y la novena semana de muestreo se produjeron condiciones de anaerobiosis, causando un aumento de las concentraciones de PRS y amonio. Luego, una vez restablecidas las condiciones de aerobisidad, las concentraciones de PRS y amonio en el efluente de salida fueron inferiores a las del efluente de entrada.

La mineralización de materia orgánica incrementó la concentración de CO₂ en agua, la cual, a su vez, disminuyó el pH de la entrada a la salida. La disminución de calcio y alcalinidad fue mayor en las muestras en las cuales el pH de entrada fue alto (8,0-12,5), sugiriendo que la precipitación de carbonato de calcio dentro del wetland representa un importante mecanismo gobernado por el pH del agua que ingresa.

La difusión desde el agua seguida por una reducción dentro del sedimento podría haber sido la causa de la disminución de la concentración de sulfato en el efluente. El sulfato pudo haber sido retenido tanto como FeS o liberado como H₂S a la atmósfera. Un fuerte olor indicó presencia de sulfuro durante los muestreos en los cuales el efluente fue anóxico.

Dombeck et al. (1998) propusieron que la precipitación es el principal mecanismo de retención de metales y determinaron que el Ni fue retenido con menor eficiencia, que otros metales, debido a la formación de complejos altamente solubles con materia orgánica. Guo et al. (1997a) estudiaron la especiación del Ni en el sedimento de un humedal a diferentes potenciales redox. A altos potenciales, el Ni sedimentó adsorbido a

óxidos de Fe y Mn, permaneciendo en solución un 15% del total. Cuando el potencial redox disminuyó la concentración de Ni soluble disminuyó significativamente; la mayor parte del Ni precipitó en forma de carbonatos y la segunda fracción en importancia precipitó unida a sulfuros y compuestos húmicos de alto peso molecular. La elevada alcalinidad y pH que prevalecieron en el humedal estudiado probablemente favorecieron la precipitación del Ni con los carbonatos incrementando su retención.

Guo et al. (1997b) determinaron que cuando el potencial redox disminuyó el Zn unido a óxidos de Fe y Mn se asoció a los carbonatos y cuando el potencial redox disminuyó hasta aproximadamente -170 mV la principal fracción de Zn fue la unida a sustancias húmicas insolubles y sulfuros. Debido a que en este estudio, el sedimento progresivamente fue cubierto por una deposición de materia orgánica, alcanzó bajos potenciales redox. Así, el Zn unido a sulfuros parecería ser el destino final del Zn en el sedimento. Ya que en el wetland estudiado también se produjo una importante acumulación de materia orgánica, los resultados del presente trabajo concuerdan con la literatura mostrando que el Zn fue probablemente retenido en forma de sulfuros.

Respecto al Cr, que es metal estudiado en esta tesis, el Cr(VI) se reduce fácilmente a Cr(III) por la materia orgánica (Losi et al., 1994; Fendorf, 1995), las elevadas concentraciones de materia orgánica y las bajas concentraciones de OD en el humedal justifican la ausencia de Cr(VI) durante el presente estudio. La baja solubilidad del Cr(III) hace que precipite como Cr(OH)_3 o también puede ocurrir que se una a compuestos húmicos insolubles de alto peso molecular a bajos potenciales redox, como los que se produjeron en el wetland estudiado, (Guo et al., 1997b), lo que dio lugar al aumento de la concentración de Cr en el sedimento de entrada. Las plantas también fueron responsables de la sorción del mismo, como podemos observar en la Tabla 14.8, que muestra los porcentajes de retención de plantas y sedimentos en dos diferentes situaciones; noviembre

2001, período de dominancia de flotantes y al finalizar la experiencia (Setiembre de 2002) en ausencia de flotantes y dominancia de *T. domingensis*. De acuerdo a estos resultados, los metales fueron almacenados principalmente en el sedimento. Sin embargo, la retención en tejidos vegetales fue significativamente mayor mientras dominaron las macrófitas flotantes. Los altos porcentajes de retención en sedimento se deben probablemente a que cuando predominaron condiciones óxicas en el agua del wetland, produciendo elevados potenciales redox, se favoreció la coprecipitación del Cr adsorbido a óxidos de Fe y Mn. Y cuando se produjeron condiciones anóxicas, conjuntamente con elevado pH, el Cr probablemente precipitó como $\text{Cr}(\text{OH})_3$ o unido a compuestos húmicos insolubles de alto peso molecular. Se comprobó que cuando las condiciones ambientales no favorecen el proceso óxico, las plantas flotantes pasan a cumplir el rol preponderante en la remoción de metales. (Maine et al, 2007).

La Tabla 14.8. muestra que los sedimentos retuvieron un porcentaje de metales significativamente mayor que las plantas, sin embargo no se debería analizar al sedimento y a las plantas como compartimentos estancos ya que las plantas contribuyeron a crear las condiciones físicas y químicas para promover la retención de los metales en el sedimento. Estos compartimentos se complementan, alternándose en su función de retener contaminantes y como resultado de esto la eficiencia del wetland se mantiene. Un wetland es un sistema dinámico, donde la remoción de contaminantes se lleva a cabo por la vegetación o los sedimentos según varíen las condiciones ambientales.

Tabla 14.8.: Porcentajes de retención de macrófitas y sedimentos en dos diferentes etapas, dominancia de flotantes (noviembre 2001 y dominancia de arraigadas (final de la experiencia).

Etapas	Cr		Ni		Zn	
	Sed	Macr	Sed	Macr	Sed	Macr
Nov 2001	78	22	81	19	75	25
Set 2002	93	7	94	6	95	5

Las concentraciones de metales registradas en el efluente de entrada fueron inferiores a las concentraciones que las especies flotantes toleran según la bibliografía (Soltan y Rashed (2003), Ingole y Bhole (2003), Delgado et al. (1993)), Como vimos en las experiencias de laboratorio, *P. stratiotes* y *S. herzogii* no presentaron síntomas de toxicidad al ser sometidas a concentraciones de hasta 6 mg l⁻¹ Cr. Por lo tanto, debido a que las concentraciones de metales registradas en el efluente de entrada al humedal construido a escala piloto fueron inferiores a las que las macrófitas flotantes y emergentes toleran, podría proponerse que la desaparición de las especies flotantes se debió a la elevada conductividad y pH del efluente de entrada. Un estudio realizado en nuestro grupo de trabajo determinó que las especies flotantes, *S. herzogii*, *P. stratiotes* y *E. crassipes*, no toleran pH mayores a 10 y conductividades superiores a 4000 umhos/cm (Hadad et al, 2006). Como los valores registrados de pH y conductividad en el efluente de entrada fueron superiores a estos valores en la mayoría de los muestreos, se puede inferir que ésta fue la causa de la temprana desaparición de las especies flotantes.



Figura 14.1. Inicio de la experiencia.



Figura 14.2. Humedal experimental a los 2 meses del inicio del funcionamiento.



Figura 14.3. Humedal experimental a los 4 meses del inicio del funcionamiento.



Figura 14.4. Humedal experimental a los 9 meses del inicio de su funcionamiento.

14.5. CONCLUSIONES

- El wetland eficientemente disminuyó las concentraciones medias y la variabilidad de los parámetros analizados en agua. Las concentraciones de los parámetros en el efluente se encontraron por debajo de los niveles guía para aguas de desecho industriales que exige la Ley provincial 1089 del año 1982.
- Es importante destacar la capacidad reguladora demostrada por el humedal porque a pesar de que la composición del agua de entrada presentó una alta heterogeneidad, los parámetros medidos en el efluente de salida disminuyeron su variabilidad temporal. Esto implica la ventaja de que el humedal actuaría como un sistema amortiguador. Si el sistema de tratamiento primario fallara y se produjera un volcado accidental con una alta concentración de metales, el humedal lo retendría.
- La importante disminución en la concentración de metales pesados en agua se debe a la sorción de los mismos por las macrófitas y fundamentalmente a la remoción por parte del sedimento.
- Mientras permanecieron en el humedal las especies flotantes removieron eficientemente Cr, Ni y Zn de efluente, pero produjeron depleción de oxígeno. Sin embargo no mostraron adecuada tolerancia a las características fisicoquímicas del efluente.
- La eficiencia de las macrófitas no puede medirse analizando únicamente sus porcentajes de remoción ya que estas además cumplen la función de proveer las condiciones físicas y químicas adecuadas para que se produzcan los procesos que llevan a cabo la remoción de contaminantes.

- La elección de las especies más adecuadas a utilizar en un humedal construido dependerá de la tolerancia de las macrófitas a las condiciones del efluente a tratar. Las macrófitas flotantes libres no representan una alternativa aconsejable para su utilización en humedales construidos para el tratamiento de aguas de desecho similares al estudiado. Debido a que *T. domingensis* creció sin mostrar síntomas de toxicidad entre las especies regionales estudiadas es la mejor alternativa para ser utilizada en sistemas de tratamiento de alta conductividad y pH, característica común de muchos procesos industriales.

15. CONCLUSIONES GENERALES

✘ *S. herzogii* y *P. stratiotes* pueden reducir la concentración de Cr y Cd en agua a muy bajos niveles, trabajando con concentraciones de hasta de 6 mg l^{-1} de estos metales, presentando la primera de las especies una mejor tolerancia, reflejada en su tasa de crecimiento.

✘ Ambas especies acumulan tanto Cr (III) como Cd principalmente en raíces y esta acumulación se produce fundamentalmente en las primeras 24 horas.

✘ La sorción de Cr por contacto directo con la solución es la principal causa del incremento de Cr en la parte aérea, siendo éste escasamente translocado desde las raíces; mientras que tanto la translocación como el contacto directo con la solución son procesos continuos y los responsables del incremento de Cd en parte aérea de las macrófitas estudiadas.

✘ Cuando el Cr se suministró en forma de Cr(VI) las plantas mostraron síntomas de toxicidad, siendo *P. stratiotes* la menos tolerante. Las eficiencias de remoción obtenidas fueron significativamente menores a las obtenidas para Cr (III).

✘ A pesar de que la sorción de Cr(VI) fue menor, se determinó que se transporta hacia las partes aéreas en mayor proporción que cuando el Cr se suministra como Cr(III).

✘ Los mohos naturalmente presentes en las raíces de *S. herzogii* afectan positivamente la remoción de Cr(VI), mientras que la presencia de bacterias no tiene una influencia significativa.

✘ En ambas especies el Cr se acumuló en mayor proporción en la superficie de la raíz. Un análisis longitudinal demostró además que se acumula preferentemente en el

extremo de la raíz (raíces nuevas, finas y de mayor área superficial, por lo tanto con mayor número de sitios de adsorción). Teniendo en cuenta estos datos y además la gran velocidad con la que el Cr es sorbido por *S. herzogii*, se podría sugerir que el Cr ingresa a la planta principalmente por adsorción, es decir fijándose a las cargas negativas de la pared celular.

✘ La formación de precipitados sobre las raíces de *P. stratiotes* probablemente provocados por sus exudados es uno de los mecanismo de remoción de Cr(III).

✘ La toma intracelular con la consecuente translocación a las hojas de la planta es uno de los mecanismos más importantes de sorción de Cd por *S. herzogii*, mientras que para *P. stratiotes* lo es el intercambio iónico.

✘ Los porcentajes de remoción de Cr(III) o Cd en agua a las diferentes concentraciones estudiadas fueron similares y en ningún caso se alcanzó el 100 % de remoción, por lo que se propuso que tanto la remoción de Cd como la de Cr (III) involucran dos procesos: uno rápido y uno lento. El rápido, virtualmente instantáneo, se produce durante los primeros minutos de contacto. La rapidez de la sorción podría sugerir que la sorción física o adsorción (fijación a las cargas negativas de la pared celular) es un importante mecanismo de remoción. Esta etapa rápida podría también incluir procesos de sorción química (absorción) como quelación. La precipitación inducida por las raíces y procesos biológicos como la toma intracelular (transporte a través del plasmalema a las células interiores) son probablemente los responsables del componente más lento de la remoción del metal de la solución.

✘ La sorción de Cd por la etapa rápida en *S. herzogii* presenta un valor límite, probablemente debido a que se saturan los sitios de adsorción. El valor límite para *P. stratiotes* parece no haberse alcanzado a las concentraciones estudiadas (a mayor concentración de Cd en agua, se produce mayor sorción de Cd por etapa rápida). Esto

puede deberse a las diferencias en el área superficial de las raíces (y por lo tanto los sitios de adsorción), siendo de $2,8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para *S. herzogii* y $4,9 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ para *P. stratiotes*.

✘ La sorción de Cd por mecanismo lento es diferente para las dos especies estudiadas. En *P. stratiotes* se alcanza un valor máximo que es independiente de la concentración de Cd inicial en agua, mientras que en *S. herzogii* a mayor concentración de Cd inicial, mayor remoción por este mecanismo lento. Cuando la concentración inicial de Cd fue de 6 mg l^{-1} la sorción por mecanismo lento fue luego de 31 días de exposición, superior a la sorción producida en la etapa rápida.

✘ El mecanismo rápido es el responsable de la mayor remoción de Cr (III), especialmente a altas concentraciones, no observándose diferencias significativas entre las especies. La remoción de Cr (III) mediante el componente lento es significativamente superior en *P. stratiotes* que en *S. herzogii* a todas las concentraciones estudiadas, debido a que la precipitación química inducida por raíces es uno de los mecanismos lentos de la remoción de Cr para *P. stratiotes*.

✘ *S. herzogii* acumula mayor cantidad de Cr que Cd mediante el mecanismo rápido, principalmente a las mayores concentraciones, y contrariamente, la acumulación de Cd por etapa lenta es mayor que la acumulación de Cr.

✘ En *P. stratiotes* no existieron diferencias significativas entre las cantidades de Cr y Cd sorbido por etapa rápida. En la etapa lenta, las cantidades acumuladas de Cr y Cd no fueron significativamente diferentes a pesar de que los mecanismos no fueron los mismos.

✘ La remoción de Cr(VI) de la solución involucra únicamente el proceso lento, probablemente debido a la falta del fenómeno de adsorción. El proceso lento se debe a procesos como la toma intracelular (transporte a través del plasmalema dentro de la

célula) y mecanismos de detoxificación. Este proceso presenta diferencias entre ambas especies, siendo mayor la remoción en *Salvinia herzogii*.

✘ Las raíces de plantas no vivas de *P. stratiotes* y *S. herzogii* pueden ser usados como biosorbentes

de Cr(III) y

Parámetro	Media ± Desv. estándar
------------------	-------------------------------

 Cd,

comportándose como material de intercambio catiónico débil. El principal mecanismo involucrado en la sorción fue el intercambio entre iones monovalentes presentes en la biomasa y los iones metálicos pesados (Cr y/o Cd) y los protones tomados de la solución.

✘ La capacidad de sorción de Cr(III) y Cd demostrada por plantas vivas y no vivas de *P. stratiotes* y *S. herzogii* las hace adecuadas para ser utilizadas en sistemas de tratamiento de efluentes industriales eficiente y de bajo costo.

✘ Cuando se utilizaron en un wetland construido a escala experimental, las especies estudiadas sorbieron eficientemente Cr, Ni y Zn de un efluente de una industria metalúrgica, que presentó alto pH y conductividad, pero produjeron depleción de oxígeno y no mostraron adecuada tolerancia a las características fisicoquímicas del efluente.

✘ En el diseño de un wetland, la decisión de utilización de especies macrofíticas, dependerá no solo de evaluar capacidad de remoción de contaminantes y tolerancia a las condiciones del efluente a tratar, sino que se debe tener en cuenta que las macrófitas cumplen la importante función de proveer las condiciones físicas y químicas adecuadas para que se produzcan los procesos que llevan a cabo la remoción de contaminantes.

Anexo I

Características del agua de utilizada en las realizadas.

pH	6,87± 0,11
<i>Turbiedad (U.N.T.)</i>	15± 5
Conductividad ($\mu\text{mhos cm}^{-1}$)	174 ± 32
Residuos secos (mg l^{-1})	122,1± 23,2
Oxígeno Disuelto (mg l^{-1})	8,4± 0,5
Alcalinidad ($\text{mg l}^{-1}\text{CaCO}_3$)	68,2 ± 2,8
Sulfato ($\text{mg l}^{-1}\text{SO}_4^{-2}$)	26,8 ± 1,8
Cloruro ($\text{mg l}^{-1}\text{Cl}^-$)	24,8 ± 1,3
Calcio ($\text{mg l}^{-1}\text{Ca}$)	16,0± 1,8
Magnesio ($\text{mg l}^{-1}\text{Mg}$)	9,2± 1,4
Sodio ($\text{mg l}^{-1}\text{Na}$)	15,2± 1,3
Potasio ($\text{mg l}^{-1}\text{K}$)	3,9 ± 0,4
Hierro Total ($\text{mg l}^{-1}\text{Fe}$)	0,07 ± 0,02
Nitratos ($\text{mg l}^{-1}\text{NO}_3^-$)	< 1,0
Nitritos ($\text{mg l}^{-1}\text{NO}_2^-$)	0,008± 0,002
Amonio ($\text{mg l}^{-1}\text{NH}_4^+$)	0,323± 0,089
Fosfato ($\text{mg l}^{-1}\text{PO}_4^{-3}$)	0,061± 0,009
Cromo ($\text{mg l}^{-1}\text{Cr}$)	ND (0,001)
Cadmio ($\text{mg l}^{-1}\text{Cd}$)	ND (0,001)

fisicoquímicas laguna experiencias

Observaciones: ND : significa no detectado y el valor entre paréntesis corresponde a la concentración del límite de detección del método empleado.

ANEXO II

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CADMIO

El cadmio fue descubierto en 1817 por F. Strohmeyer de una impureza en la calamina (carbonato de cinc). No se encuentra naturalmente en su estado elemental. Frecuentemente se presenta en pequeñas cantidades asociado a minerales de cinc como la esfalerita (ZnS). Minerales propios son la greenockita o blenda de cadmio (CdS), que es el único importante, la otavita (CdCO₃) y la monteponita (CdO). Representa el 1,5x10⁻⁵% en peso de la corteza terrestre. Mayormente el cadmio se obtiene como subproducto en el procesado de minerales de cinc, cobre y plomo. El cadmio elemental es un metal blanco plateado, brillante, dúctil y blando que puede cortarse fácilmente con un cuchillo y cruje al doblarlo. Se parece bastante al cinc en sus propiedades físicas y químicas. Tiene una alta sección de captura de neutrones térmicos. Presenta una conductividad eléctrica cuatro veces menor que la del cobre.

Es estable al aire; pierde el brillo al cabo de bastante tiempo. Al calentarlo forma una capa uniforme de óxido y a temperaturas elevadas arde con llama rojo amarillenta formando humo marrón de óxido de cadmio. Es insoluble en bases, se disuelve en ácido nítrico diluido y es poco soluble en los ácidos sulfúrico y clorhídrico. El cadmio es componente de algunas de las aleaciones de más bajo punto de fusión. Se usa en aleaciones de cojinetes con bajo coeficiente de fricción y gran resistencia a la fatiga. El 60% de su uso es en electrodeposición: recubrimientos de acumuladores y rectificadores, así como también en muchos tipos de soldadura, baterías níquel-cadmio recargables y barras de control del flujo de neutrones en los reactores nucleares. El óxido de cadmio se usa en galvanotecnia, como catalizador en reacciones de hidrogenación y en la síntesis de metano, en la fabricación de esmaltes y en sinterización. El hidróxido se usa en galvanotecnia y en la fabricación de electrodos negativos de baterías de níquel-cadmio. El cloruro se utiliza en

galvanotecnia, fotografía, tintorería y absorbente de H_2S . El sulfuro se usa como pigmento amarillo. El estearato de cadmio se emplea en la mejora de la estabilidad de los materiales de PVC frente a la luz y los agentes atmosféricos. Silicatos y boratos de cadmio presentan fosforescencia y fluorescencia y se usan como componentes de las sustancias fosforescentes de televisión en blanco y negro y activadores para producir color azul y verde de tubos de TV color.

2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CROMO

El cromo fue descubierto en 1797 por Nicolas-Louis Vauquelin. No se presenta en forma elemental. La fuente principal es la cromita ($FeCr_2O_4 = FeO.Cr_2O_3$). Otros son la crocoíta ($PbCrO_4$), fenicrocoíta [$Pb_3O[CrO_4]_2$]. Se encuentra en la corteza en un 0,0102% en peso. El nombre se debe a la multitud de colores que presentan sus combinaciones.

La producción industrial comenzó en 1898. El cromo elemental es un metal gris-acero, muy brillante, blando y fácilmente maleable, que se vuelve quebradizo por la presencia de impurezas. Su conductividad eléctrica es un 11% de la del cobre. Es estable al aire y no reacciona con el agua. Los oxidantes fuertes originan una capa de óxido que lo hace estable y posteriormente no lo atacan los ácidos diluidos. Se disuelve en ácidos no oxidantes con desprendimiento de hidrógeno. Es soluble en agua regia y en ácido fluorhídrico e insoluble en bases. A temperaturas elevadas reacciona con casi todos los metales.

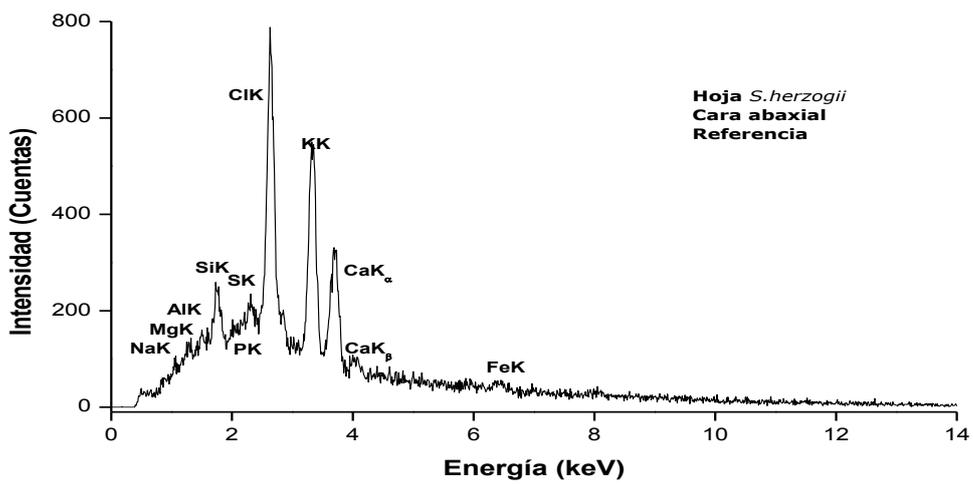
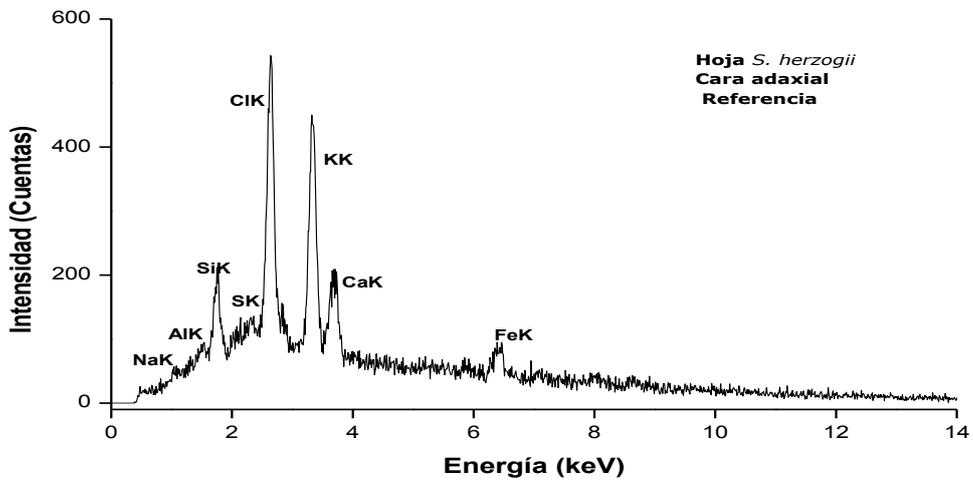
Se usa para endurecer el acero, obtener acero inoxidable y otras aleaciones muy importantes, debido a su resistencia a la corrosión, fundamentalmente como ferrocromo (Fe con 52-75% de Cr), que se obtiene a partir de la cromita en hornos eléctricos empleando carbono o azufre como reductores. El principal uso es el cromado que produce superficies duras y brillantes que impiden la corrosión. Es un proceso electrolítico en el

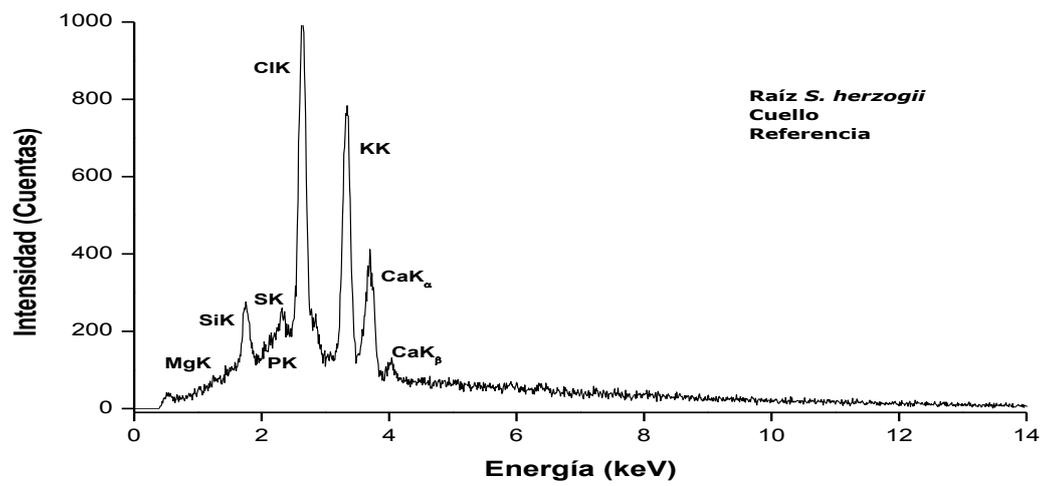
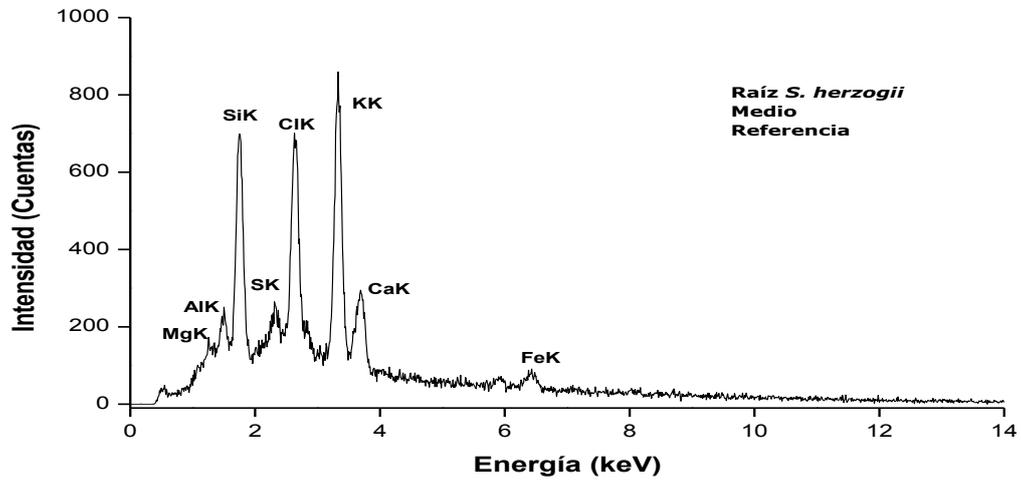
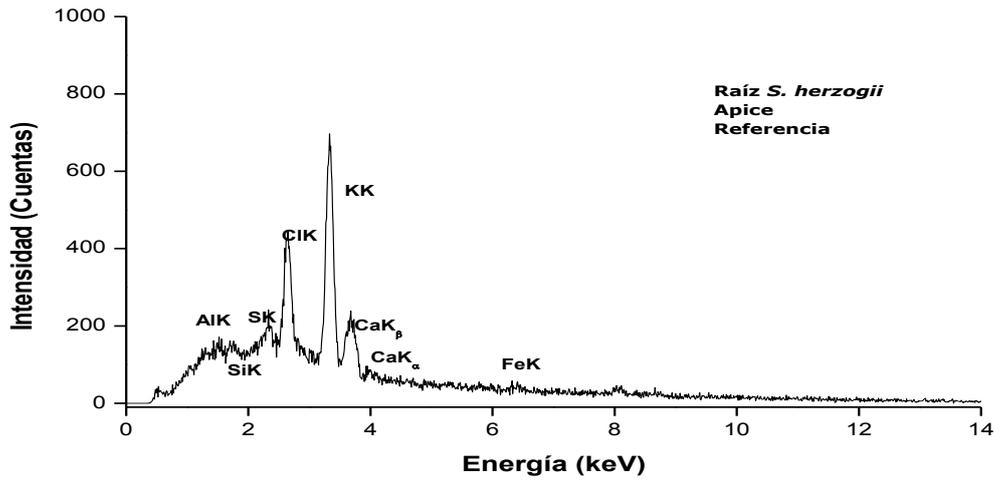
que el cromo se deposita sobre la superficie de un metal previamente niquelado. La industria aeronáutica y otras lo utilizan para el anodizado de aluminio. La cromita ha encontrado aplicación en la industria de los materiales refractarios para la obtención de ladrillos y moldes, ya que tiene alto punto de fusión, moderada dilatación y es bastante estable. Sus sales dan al vidrio un color verde esmeralda. Todos los compuestos de cromo son coloreados; los más importantes son los cromatos de sodio y potasio (amarillos) y los dicromatos (naranjas) y alumbres de cromo potasio y amonio (violetas). Los cromatos y dicromatos son puntos de partida para la obtención de colorantes, inhibidores de la corrosión, fungicidas, esmaltes cerámicos. Los dicromatos se utilizan como oxidantes en análisis cuantitativo y también en el curtido de cuero: el dióxido de azufre reduce el cromato de sodio a $\text{Cr}(\text{OH})\text{SO}_4$ que se une al colágeno de la piel, la hace insoluble e impide su degradación biológica, pero la mantiene flexible. La industria textil usa alumbres de cromo como mordientes. El Cr_2O_3 es muy duro, se emplea en el coloreado de vidrios y porcelanas (color verde) y además como catalizador. El CrO_2 es material ferromagnético utilizado para recubrimiento de las cintas de casete de "cromo" ya que responde mejor a los campos magnéticos de alta frecuencia que las cintas convencionales de "hierro" (Fe_2O_3).

Anexo III:

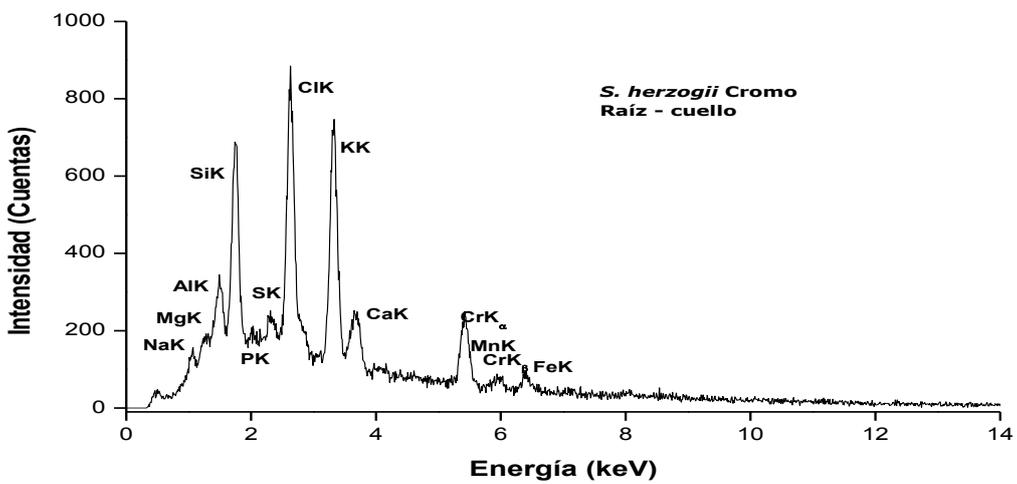
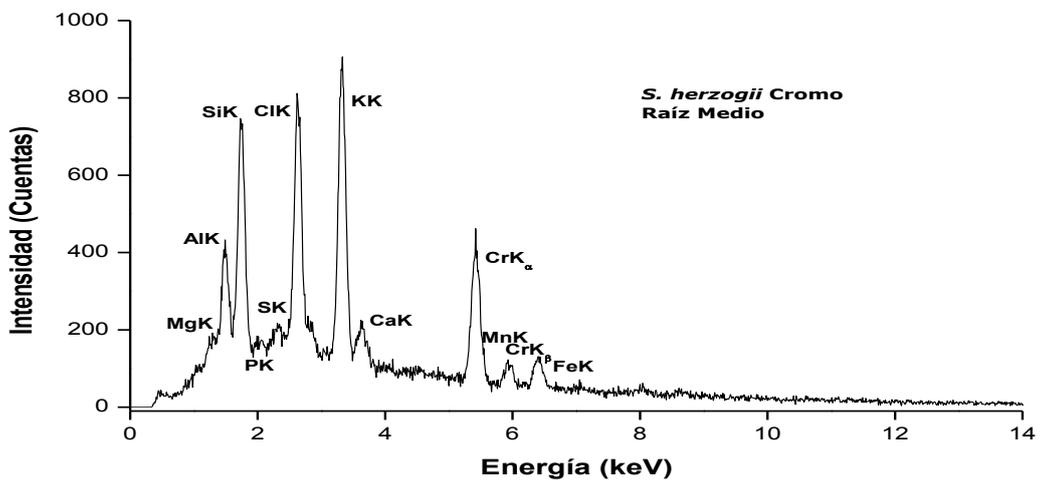
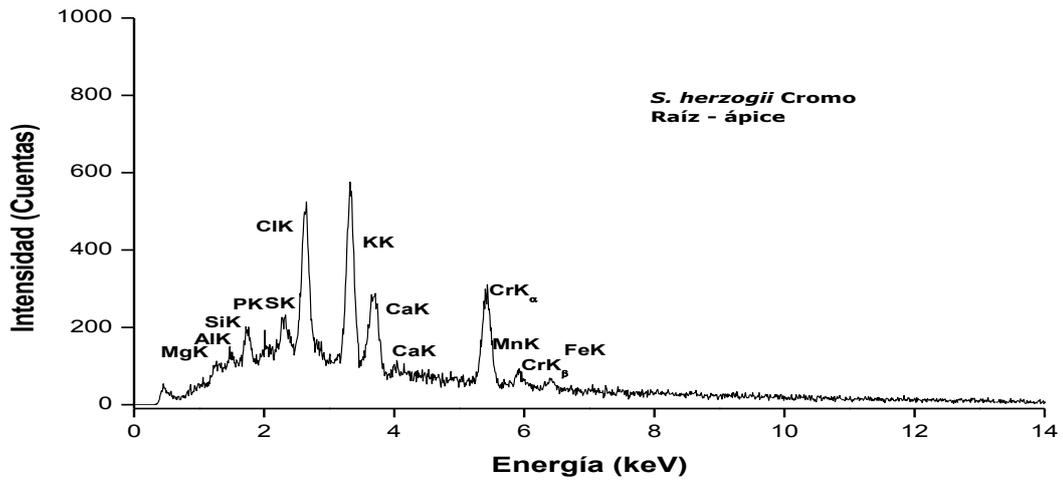
Espectros del análisis por espectroscopía de Rayos X

Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *S. herzogii* utilizadas como referencia

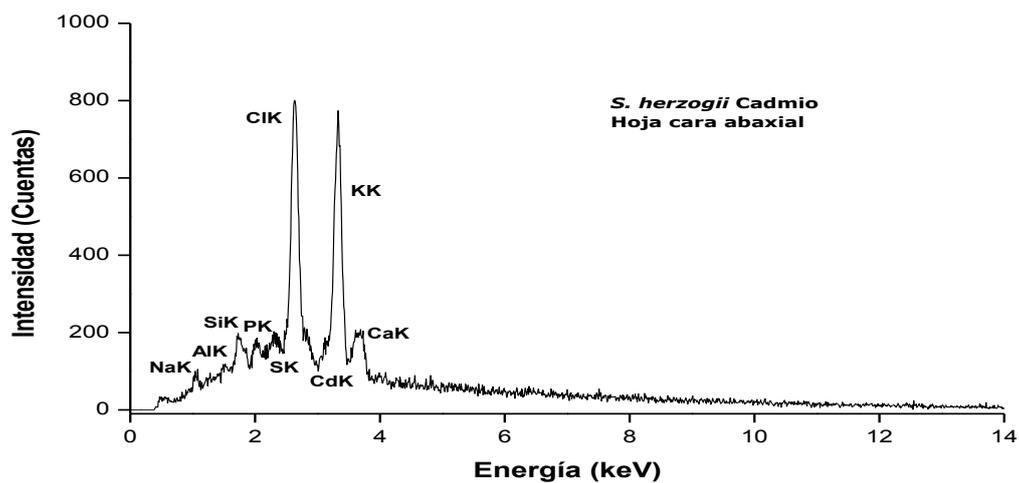
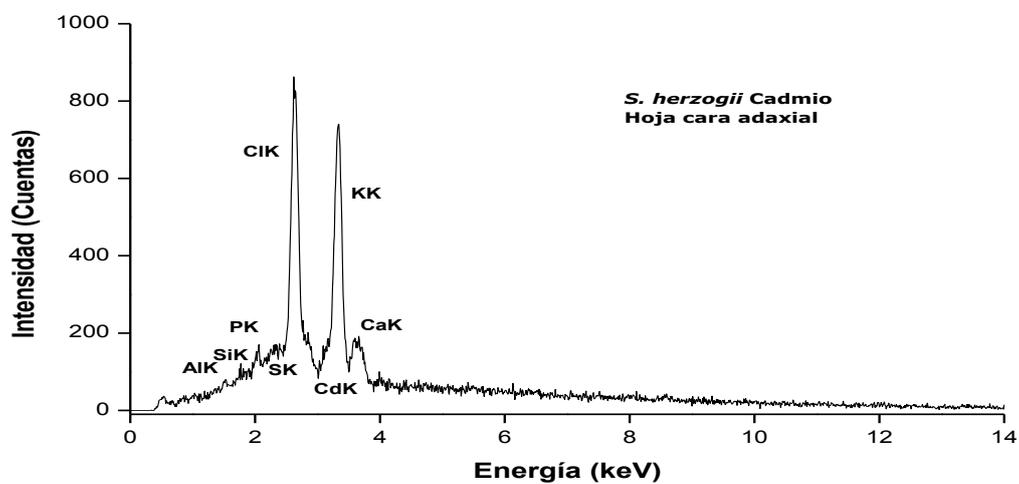




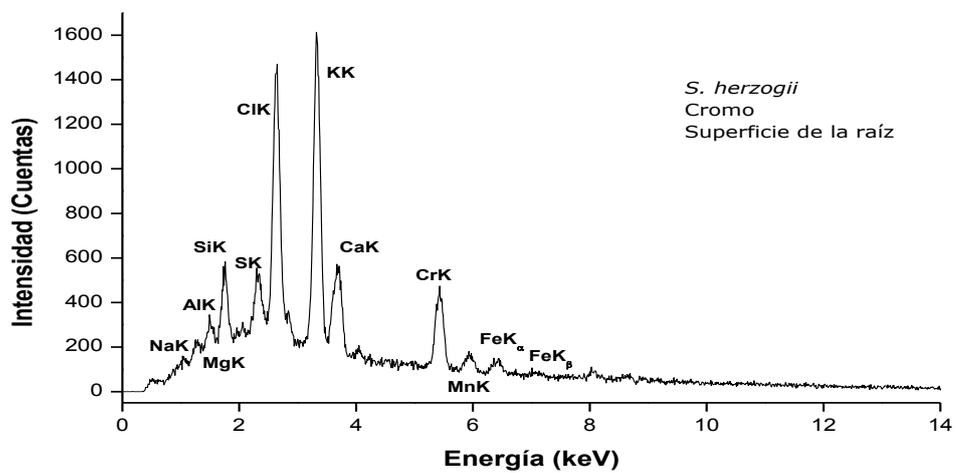
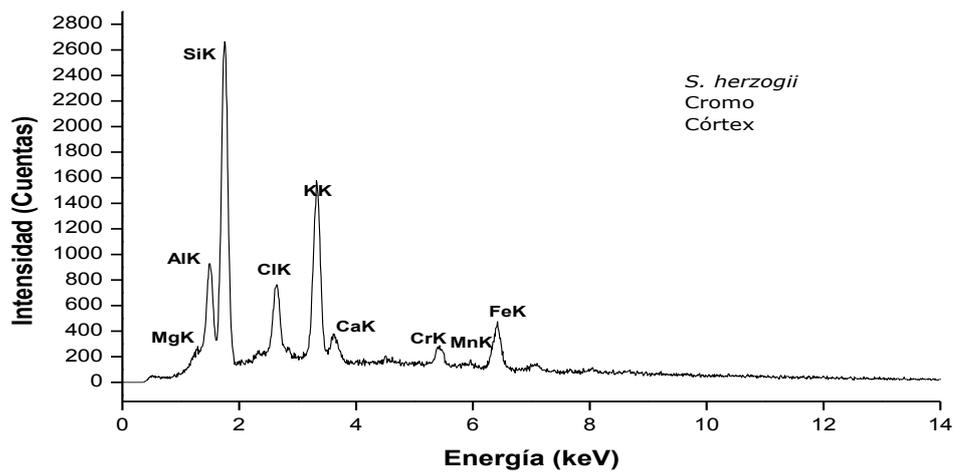
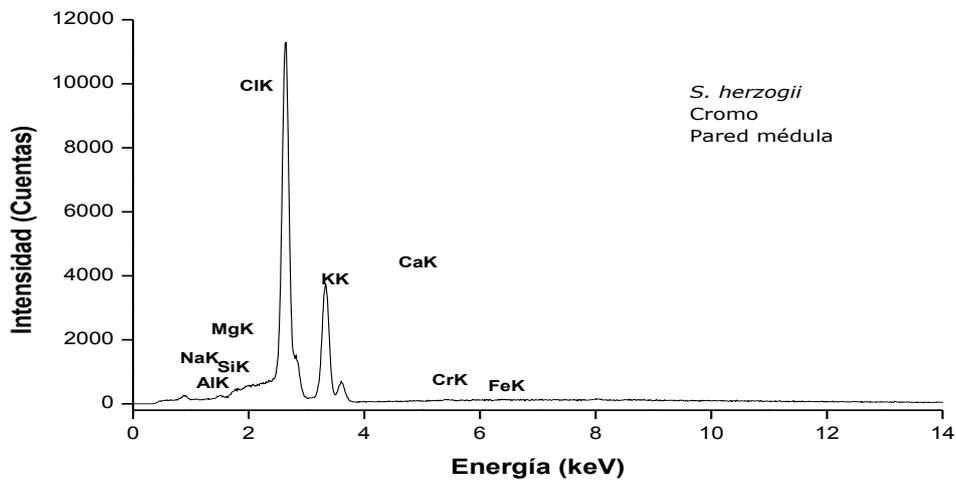
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *S. herzogii* contaminadas con Cr (III).
Análisis longitudinal.



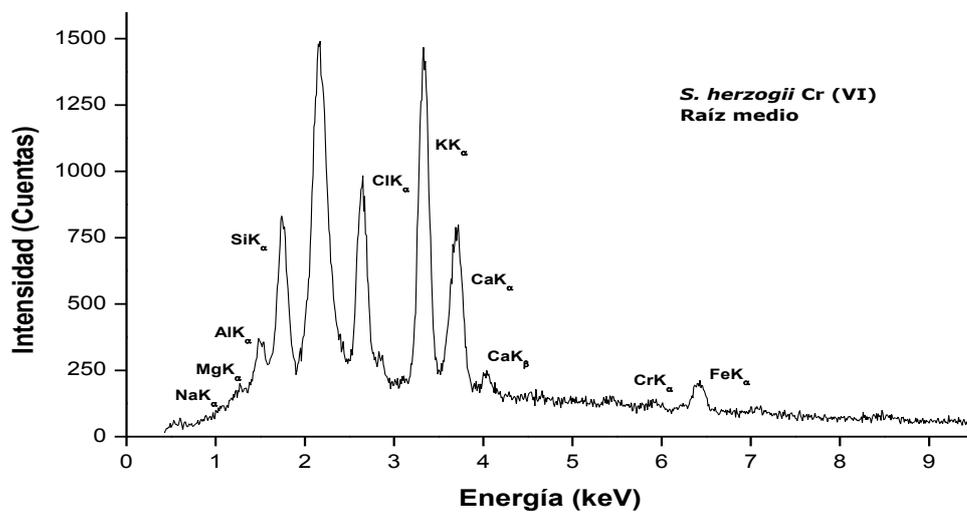
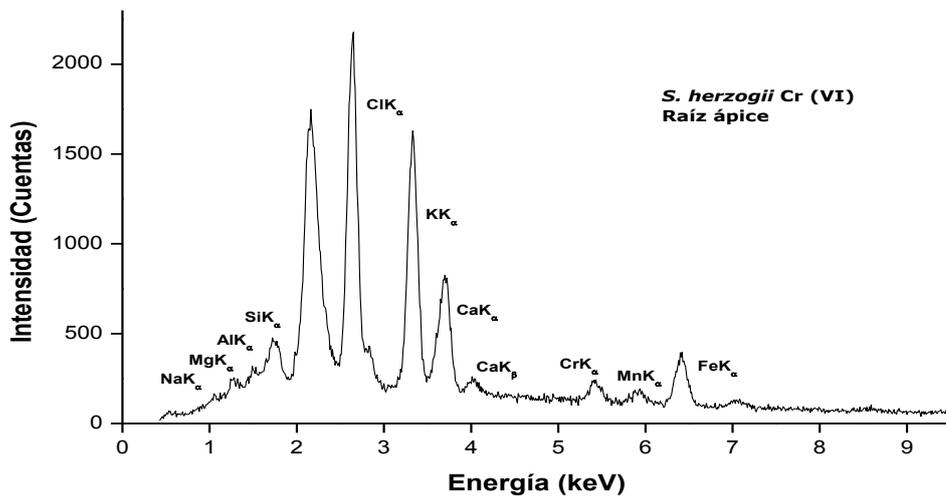
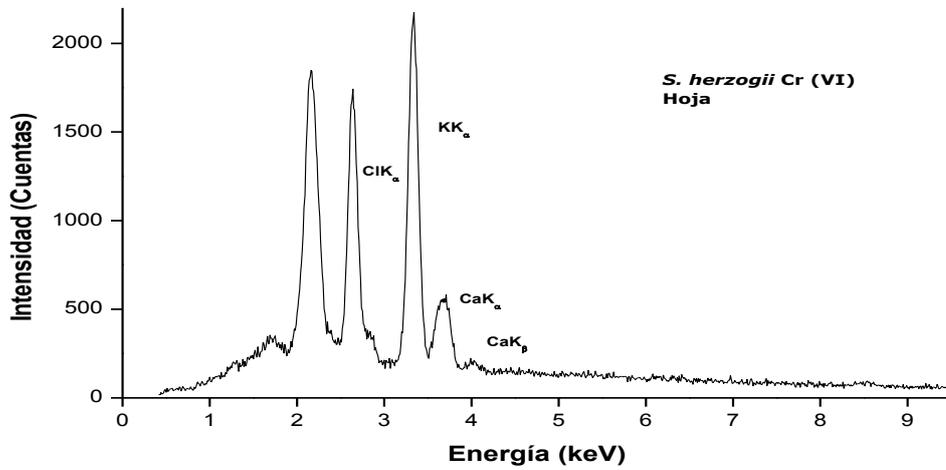
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *S. herzogii* contaminadas con Cr (III).
Hojas.



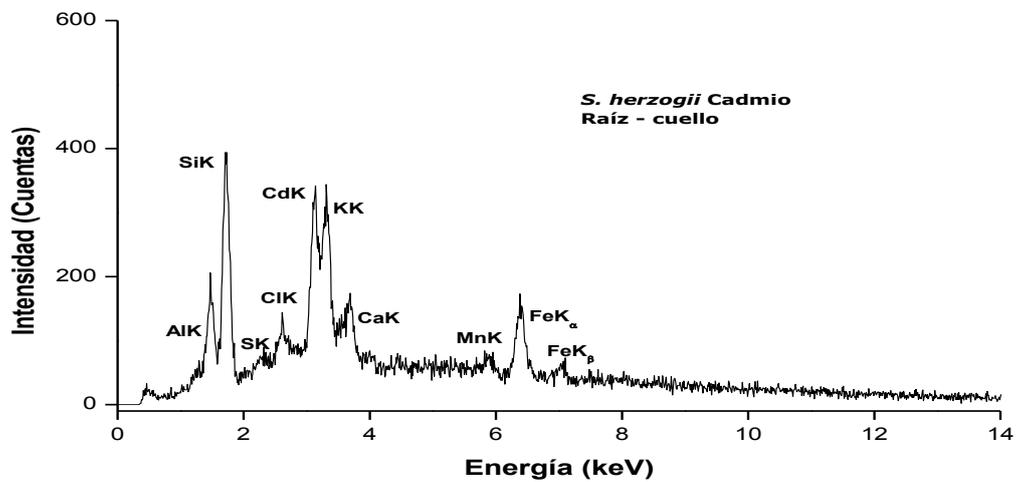
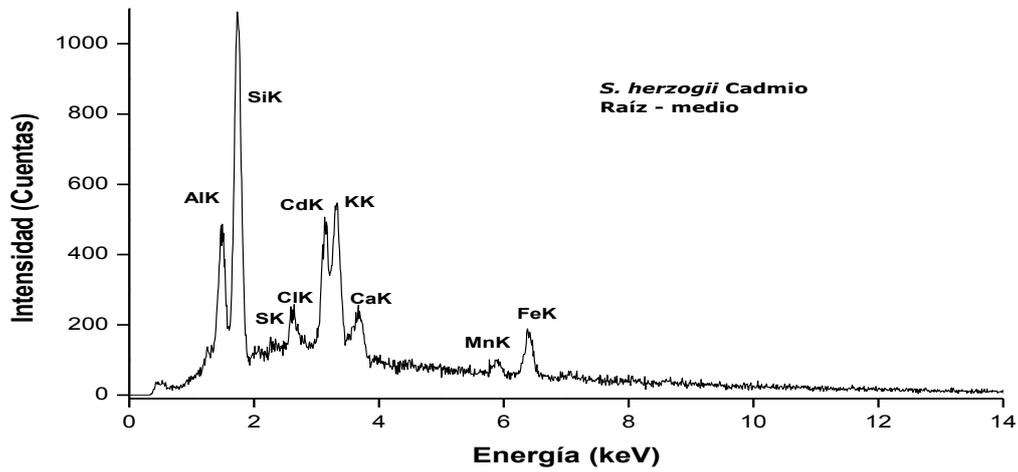
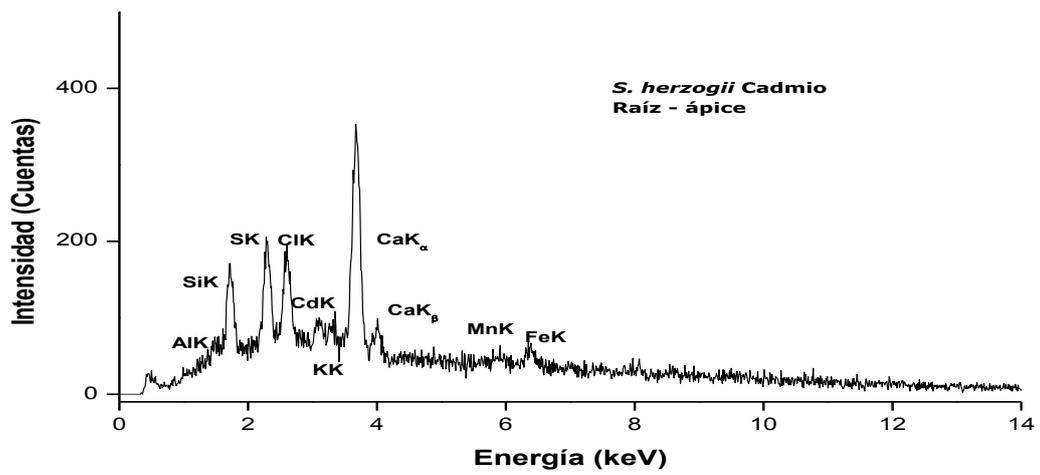
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *S. herzogii* contaminadas con Cr (III).
Análisis transversal.



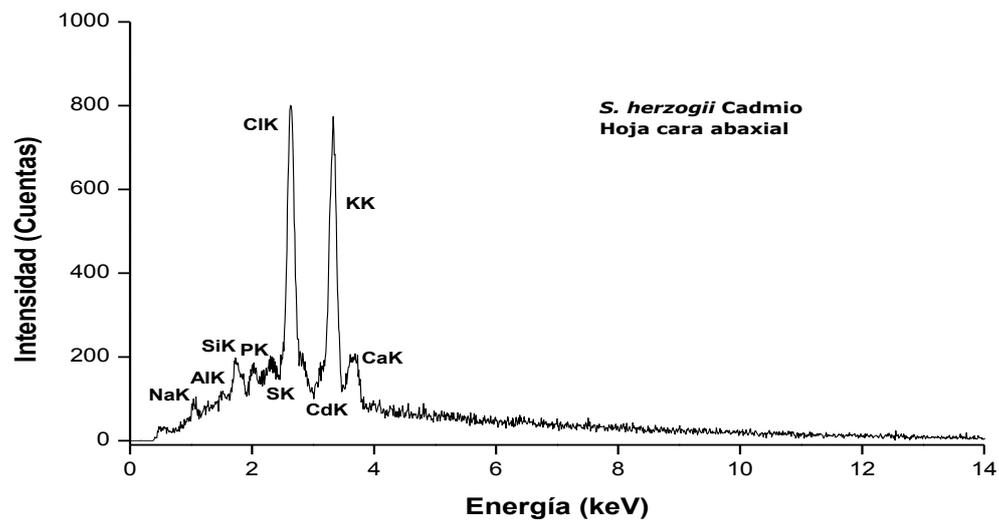
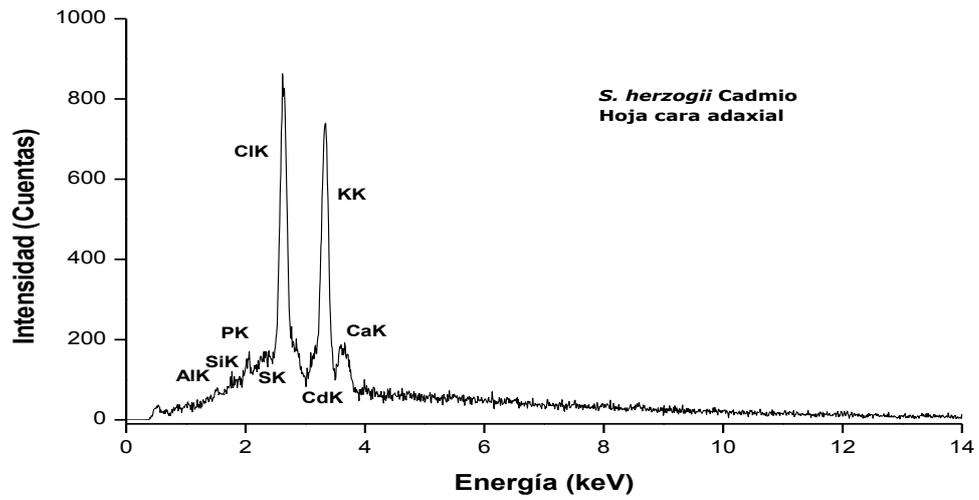
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *S. herzogii* contaminadas con Cr (VI).



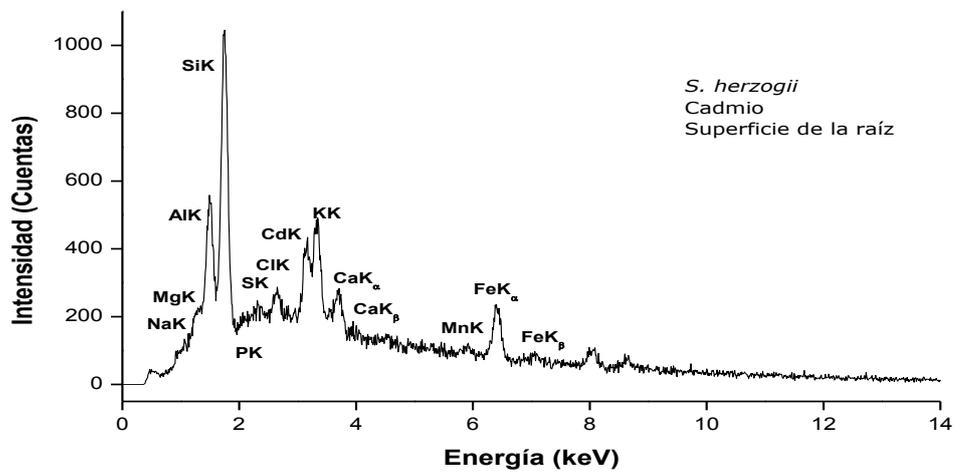
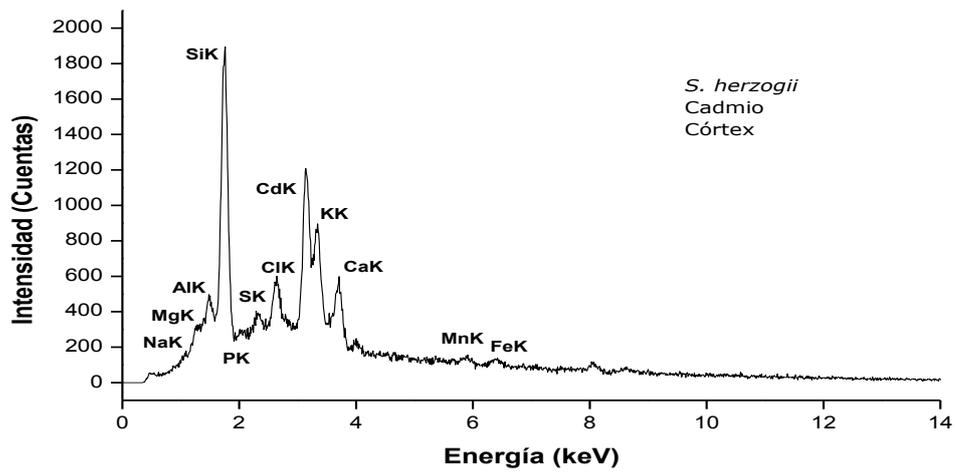
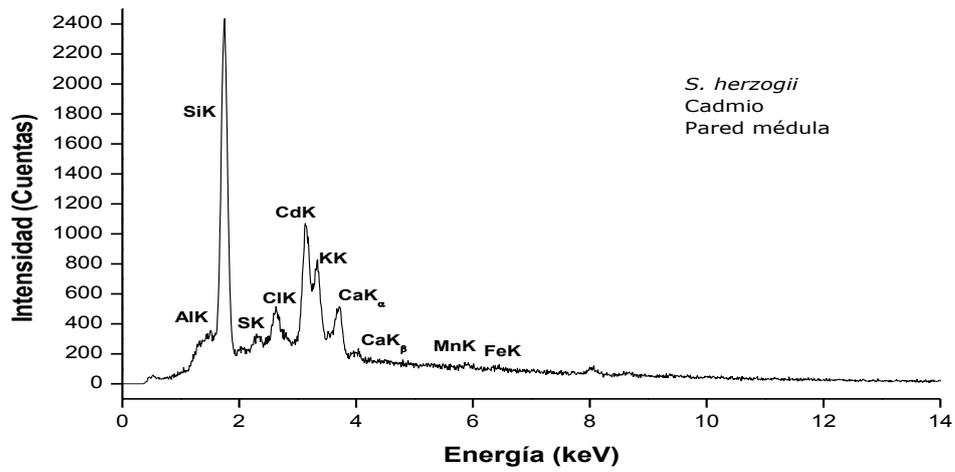
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *S. herzogii* contaminadas con Cd. Análisis longitudinal.



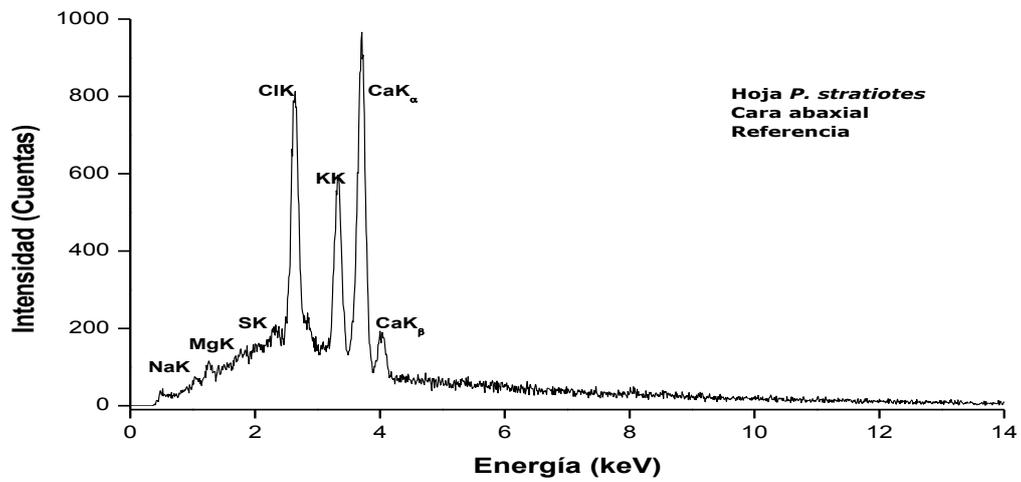
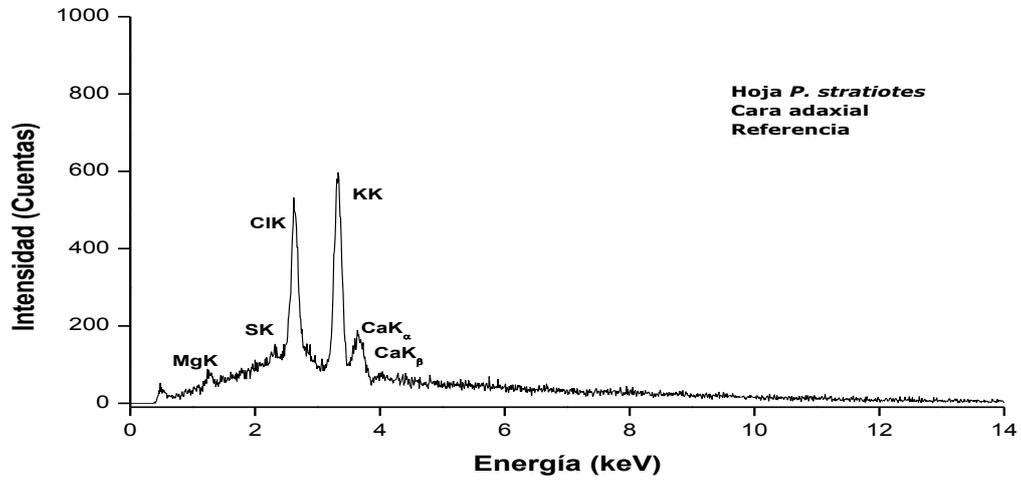
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *S. herzogii* contaminadas con Cd. Hojas.

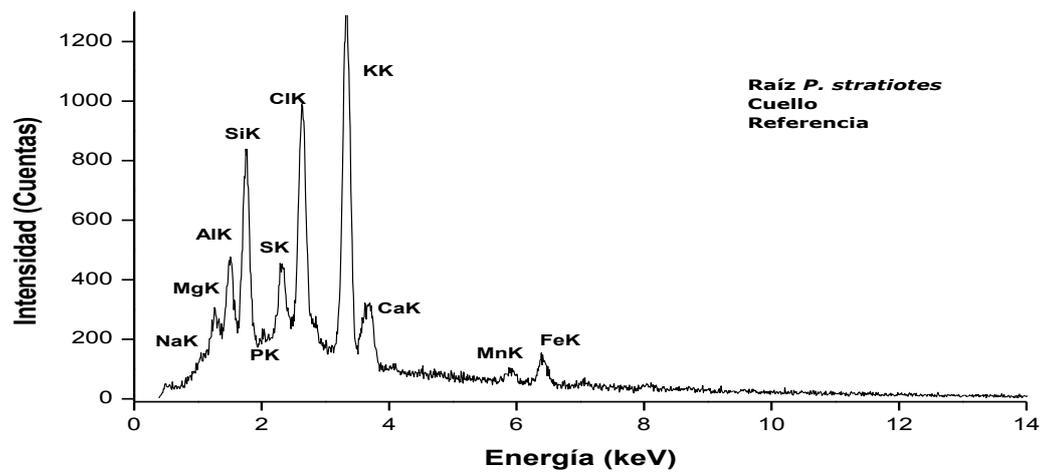
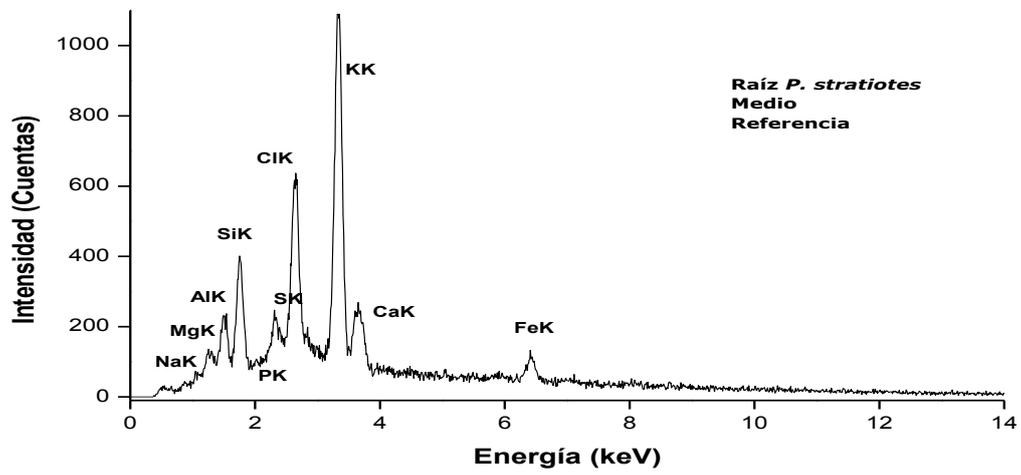
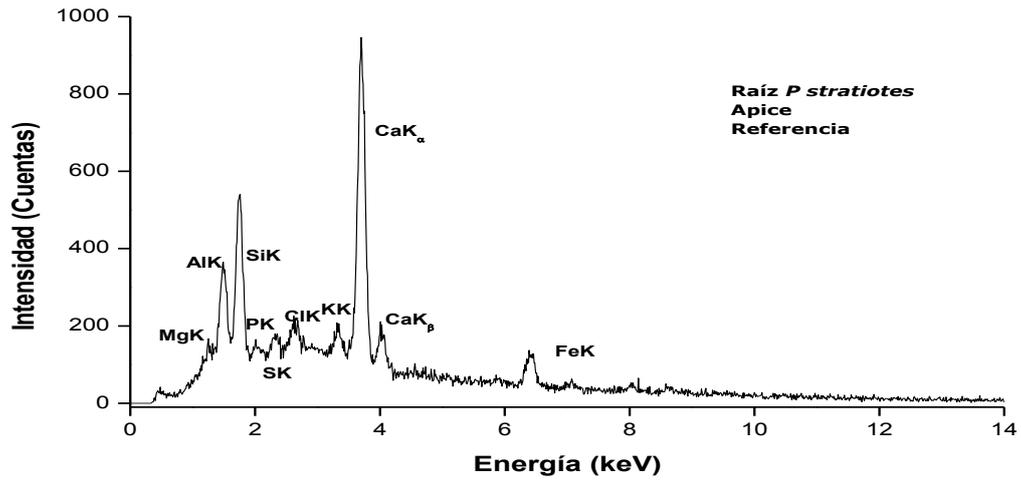


Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *S. herzogii* contaminadas con Cd.
Análisis transversal.

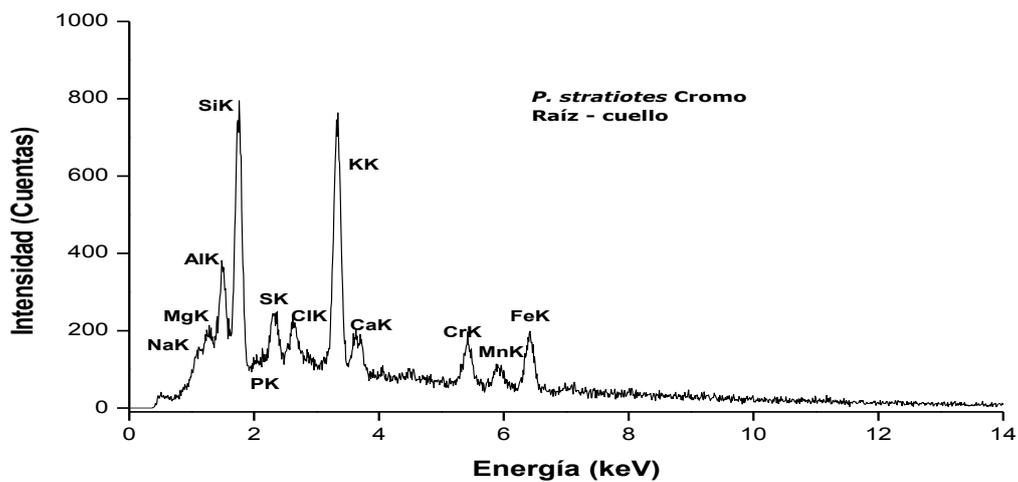
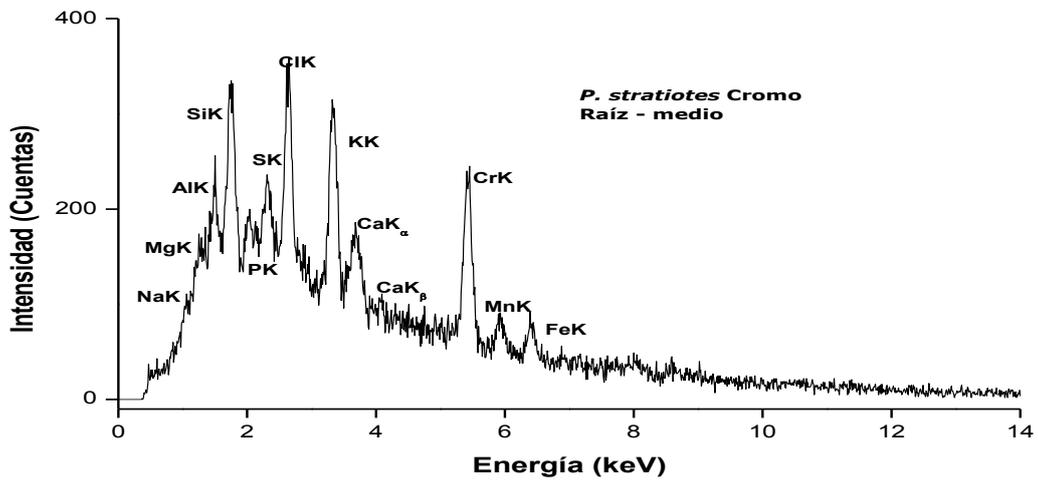
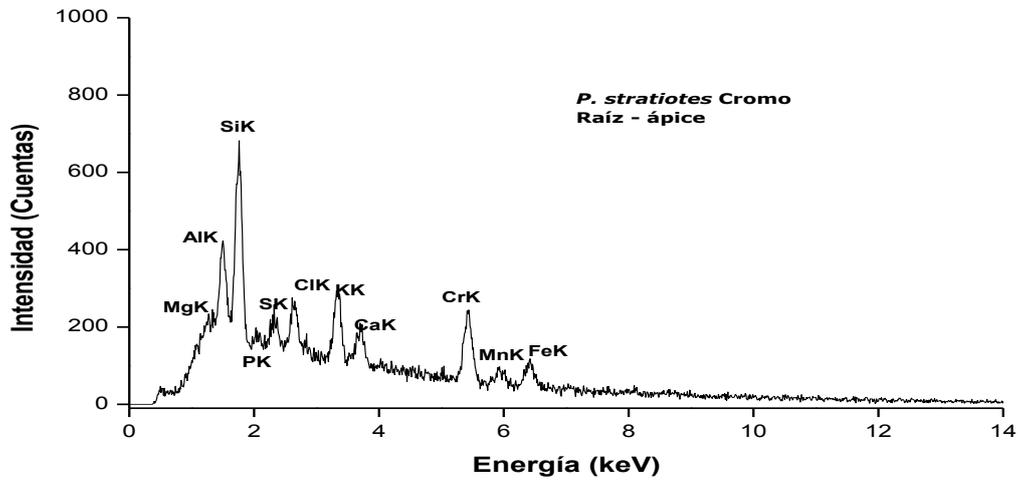


Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *P. stratiotes* utilizadas como referencia

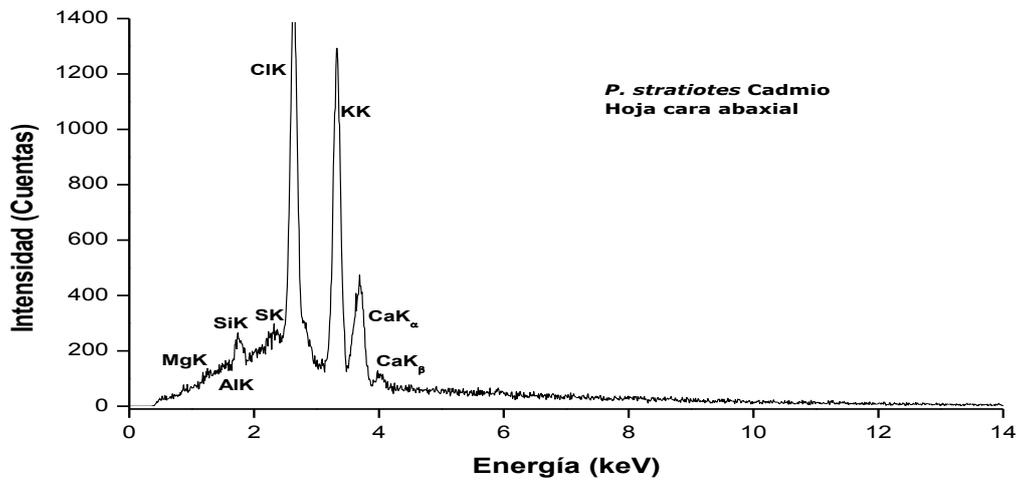
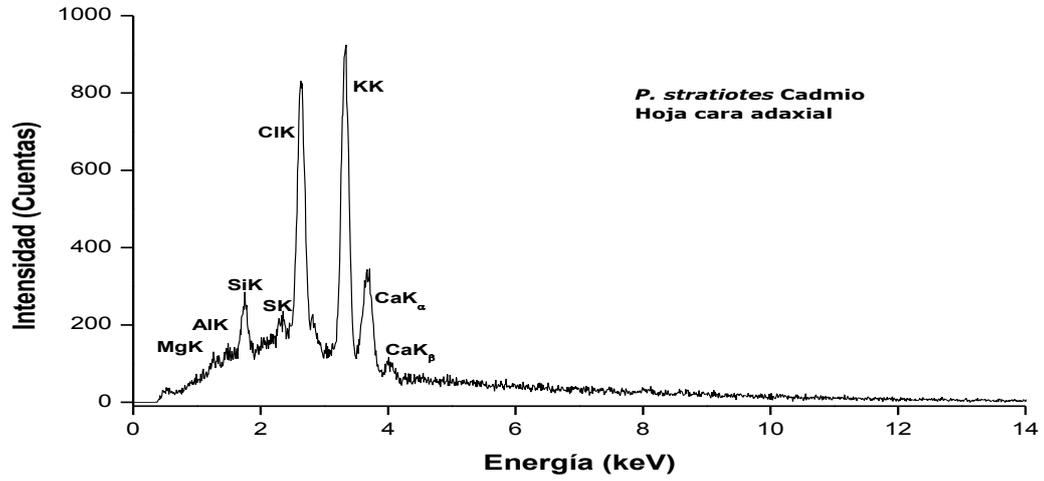




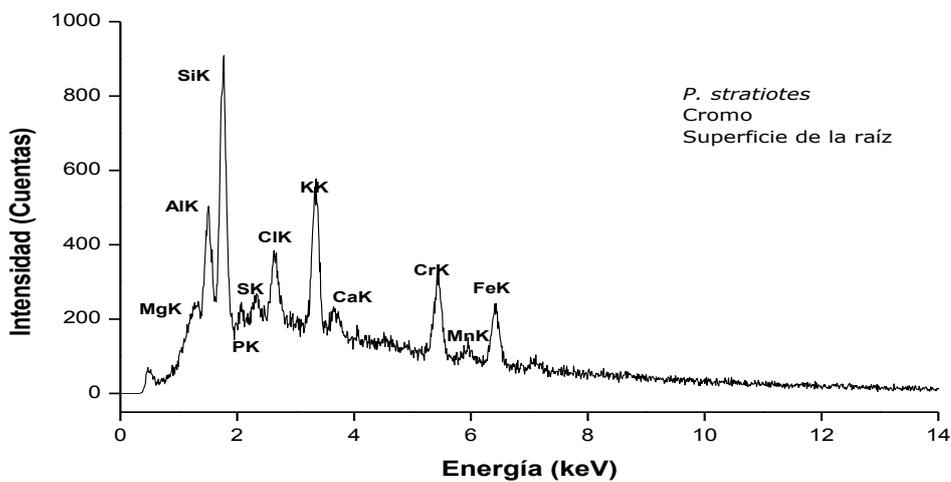
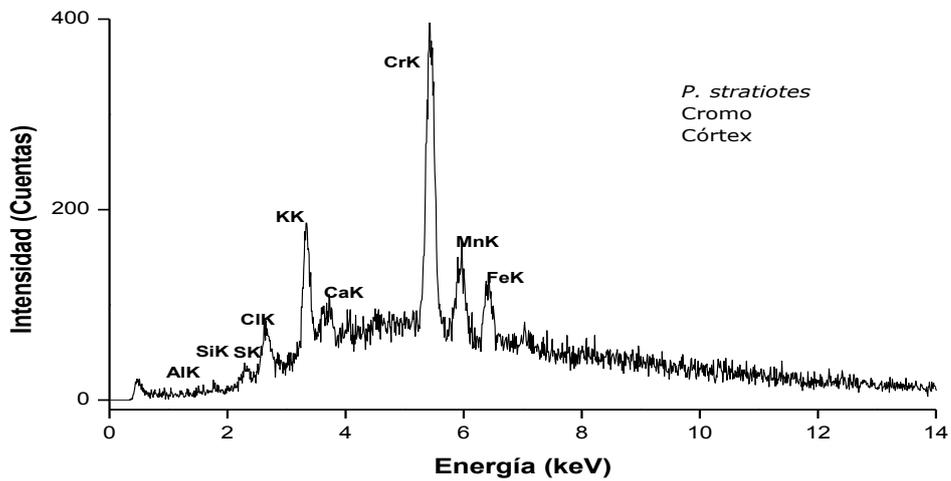
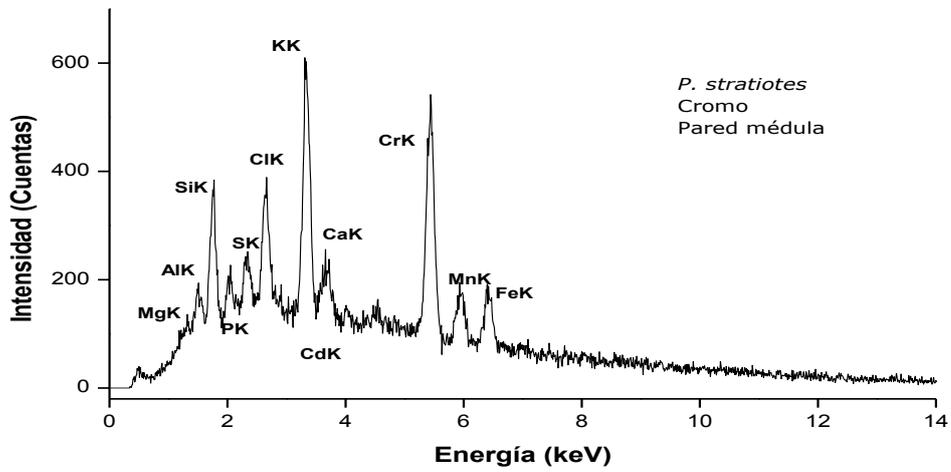
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *P. stratiotes* contaminadas con Cr (III).
Análisis longitudinal.



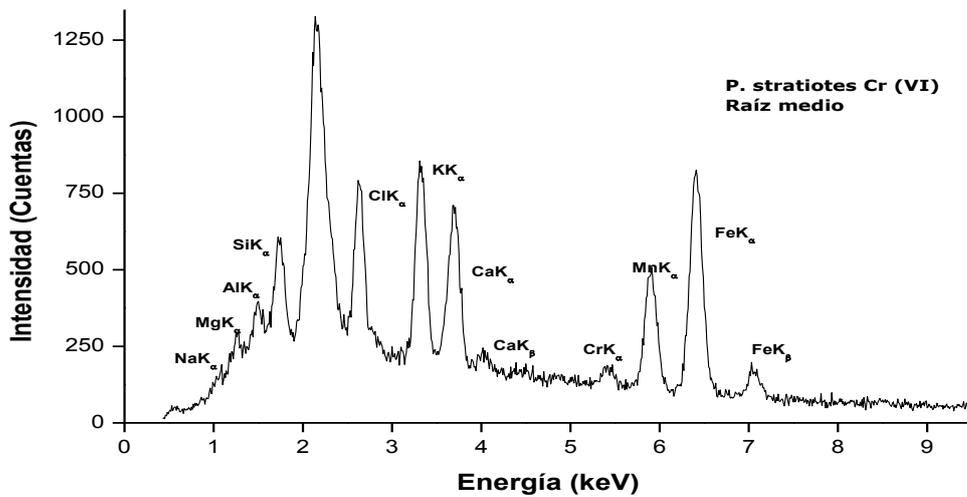
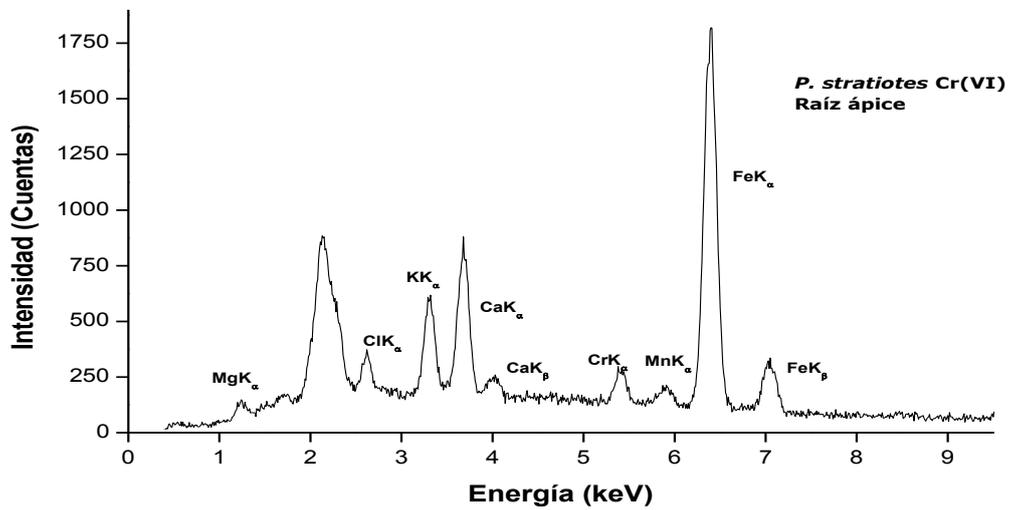
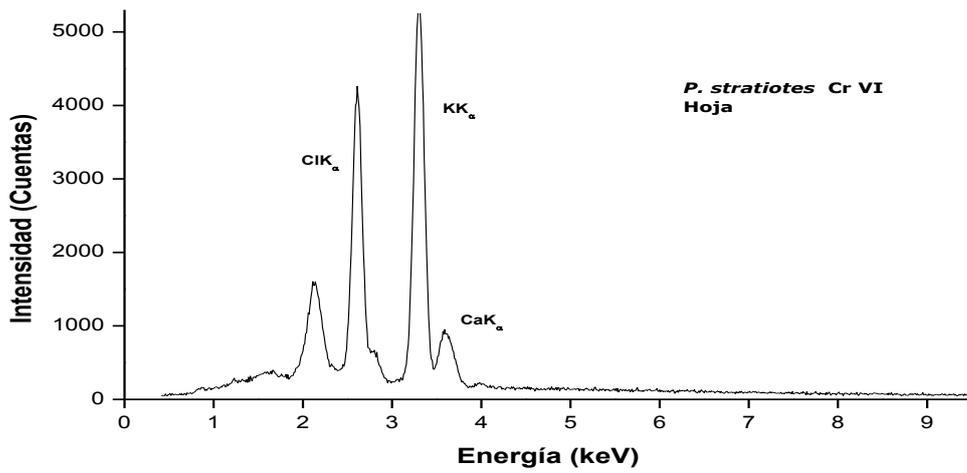
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *P. stratiotes* contaminadas con Cr (III).
Hojas.



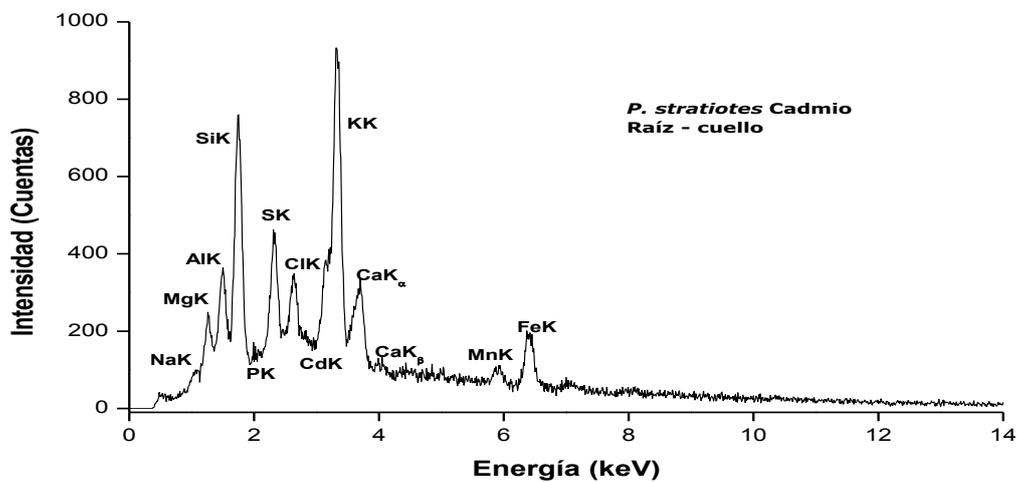
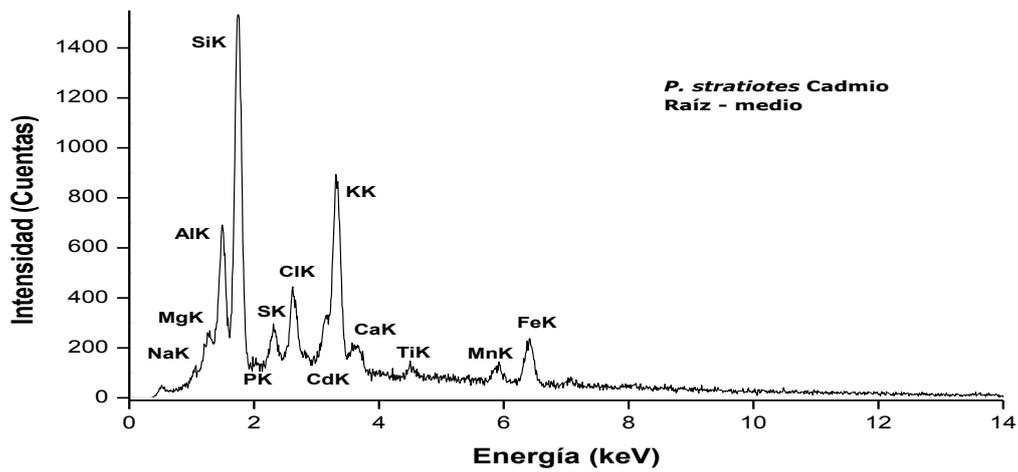
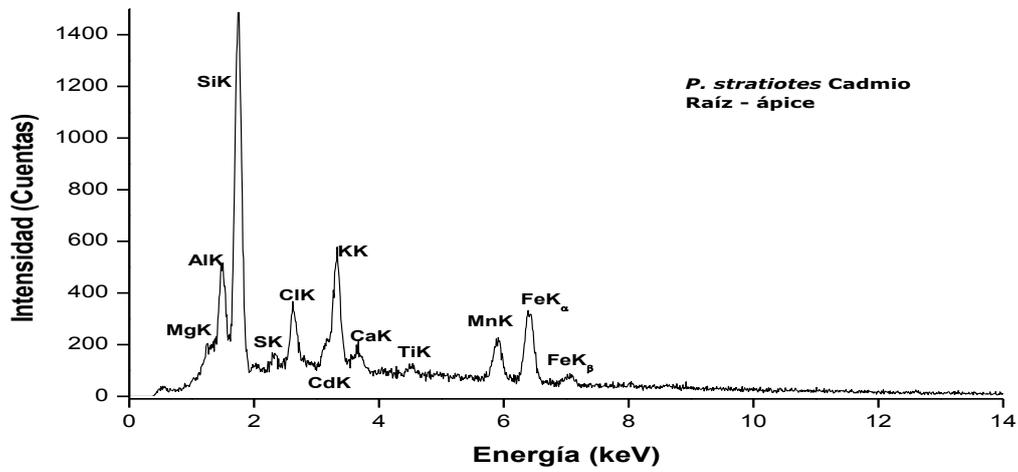
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *P. stratiotes* contaminadas con Cr (III).
Análisis transversal.



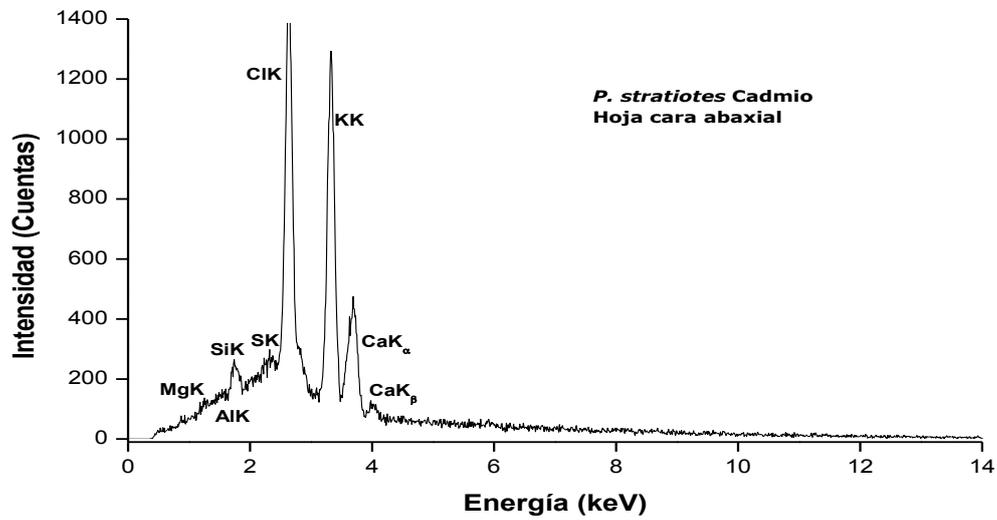
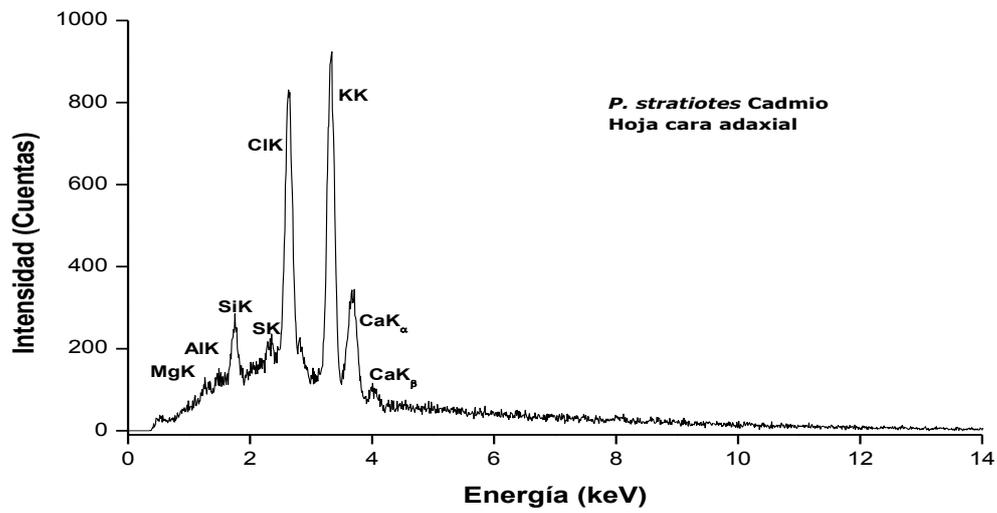
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *P. stratiotes* contaminadas con Cr (VI)



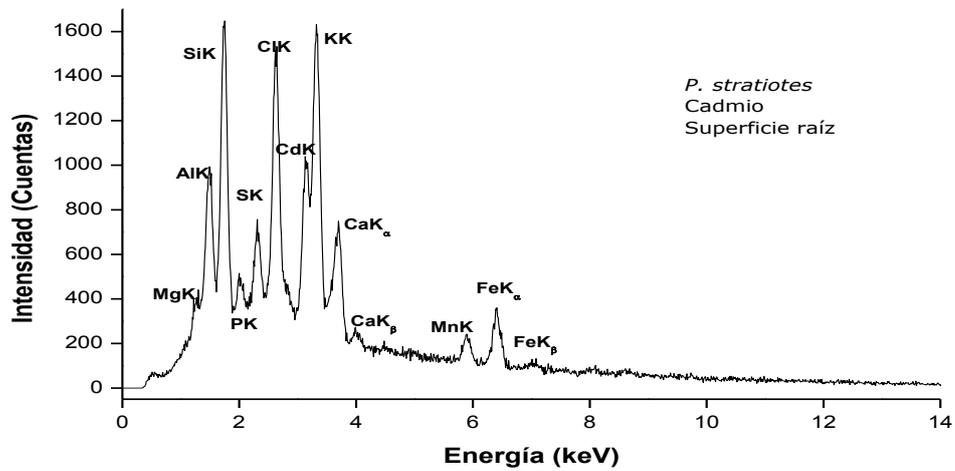
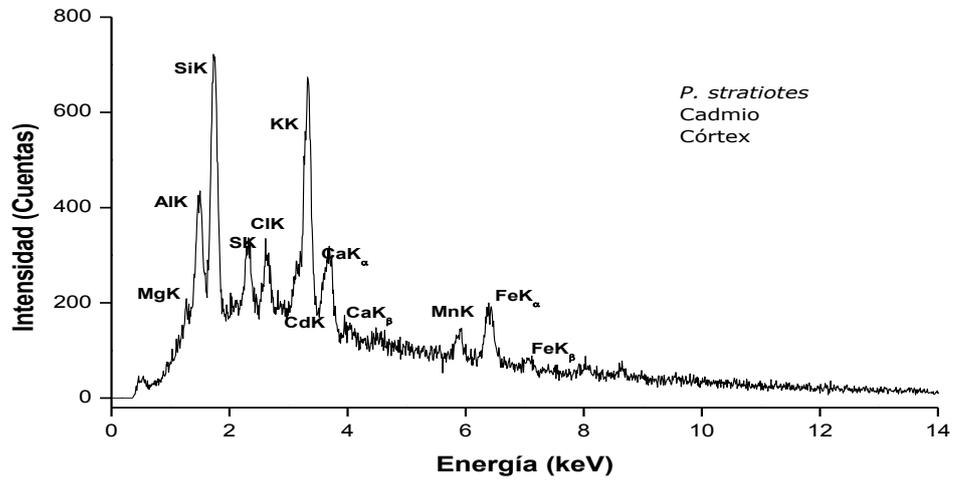
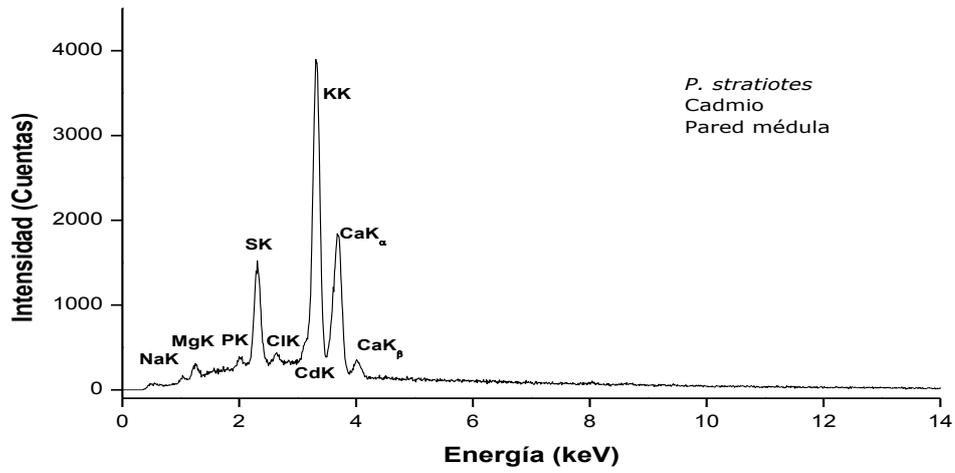
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *P. stratiotes* contaminadas con Cd. Análisis longitudinal.



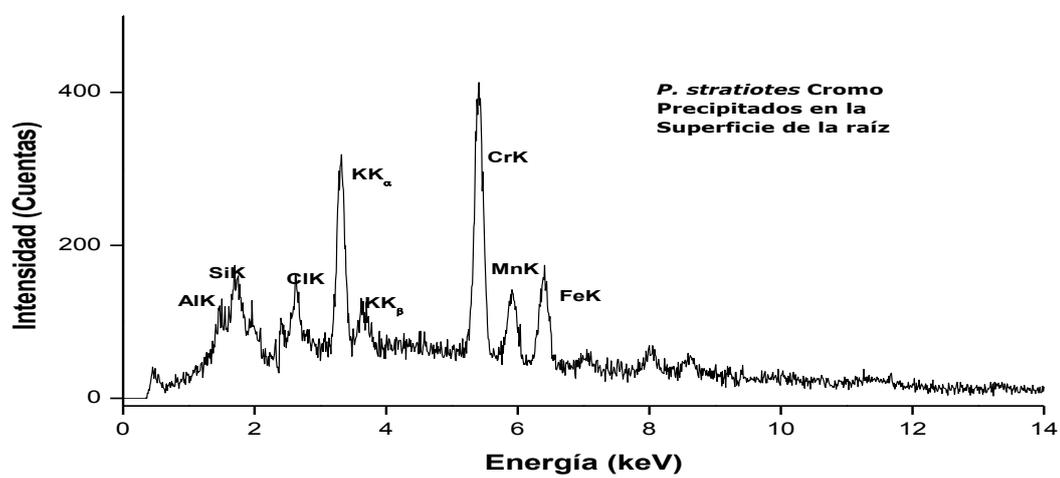
Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *P. stratiotes* contaminadas con Cd. Hojas.



Espectros del análisis por Rayos X de plantas de *P. stratiotes* contaminadas con Cd.
Análisis transversal.

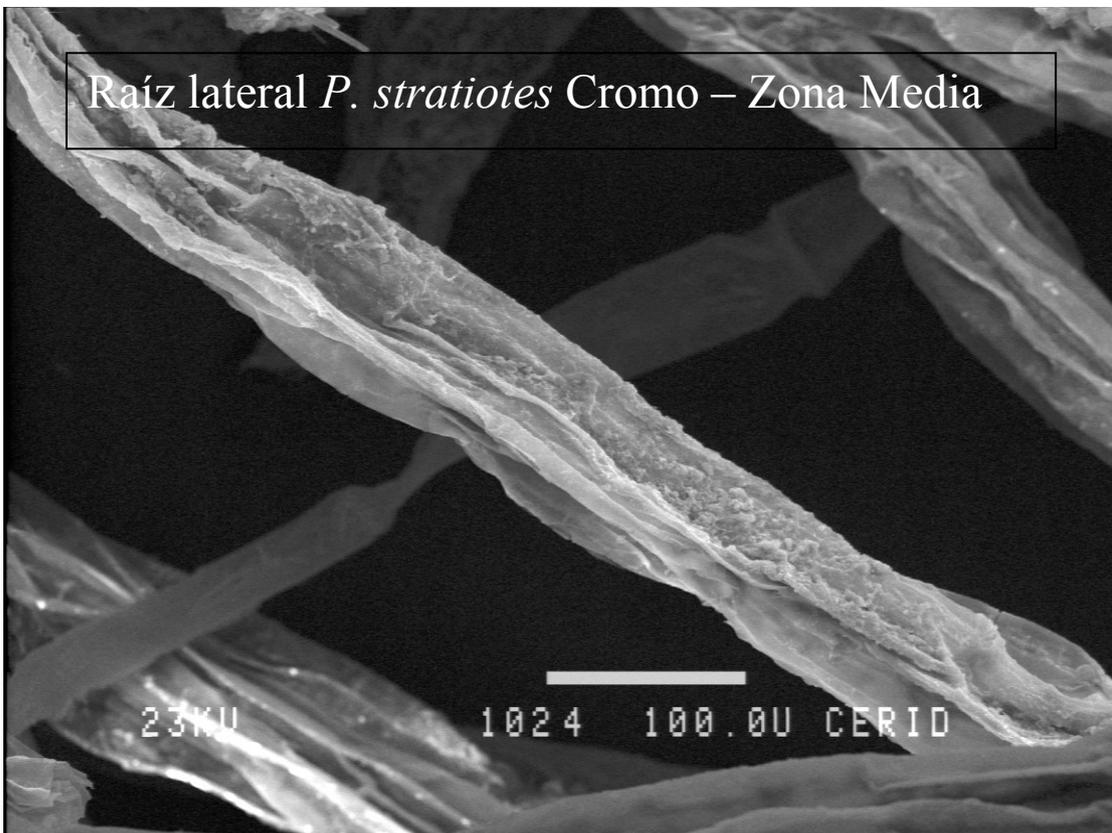
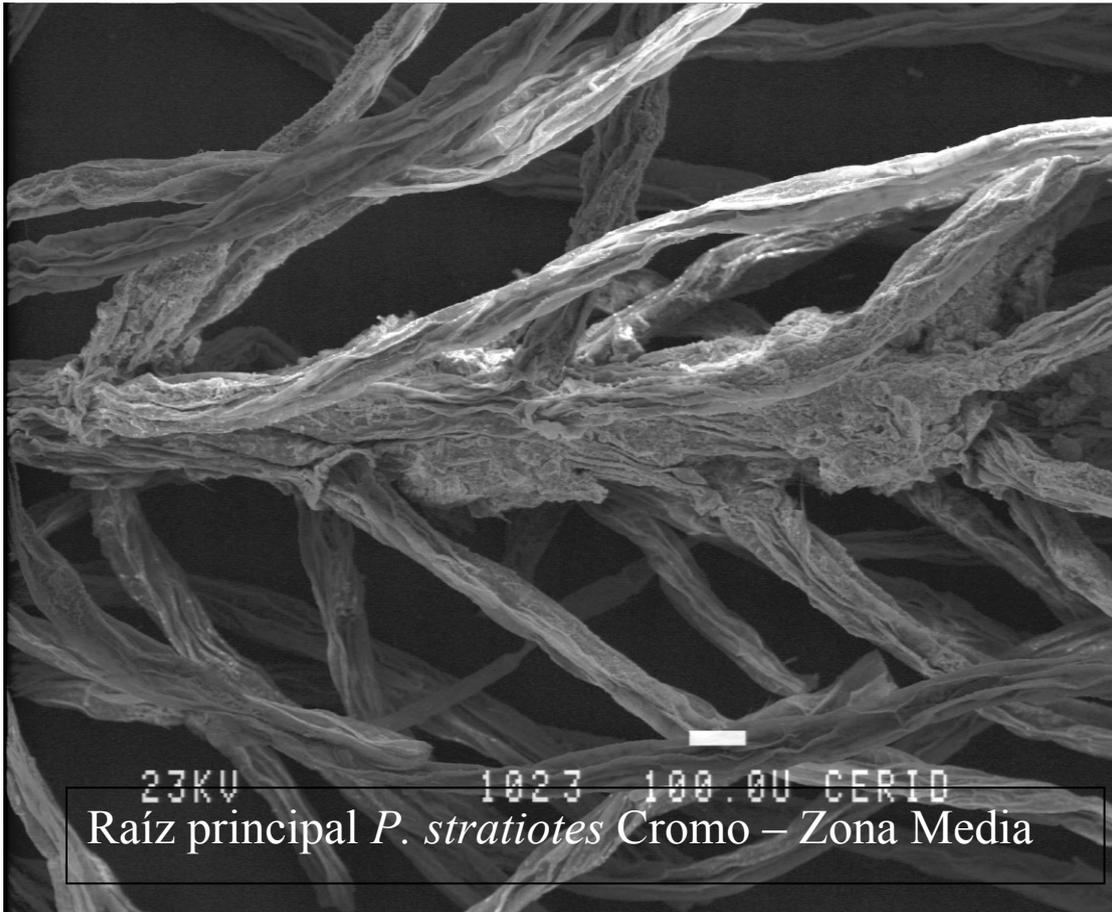


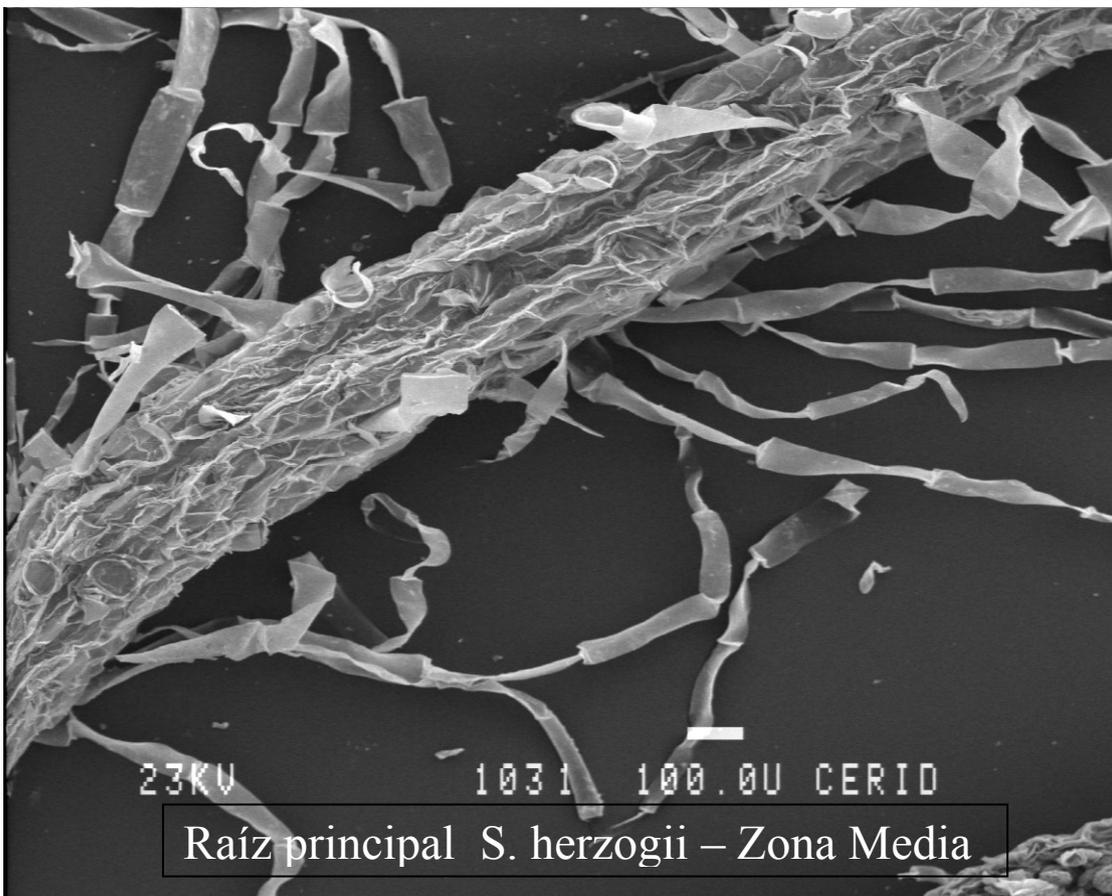
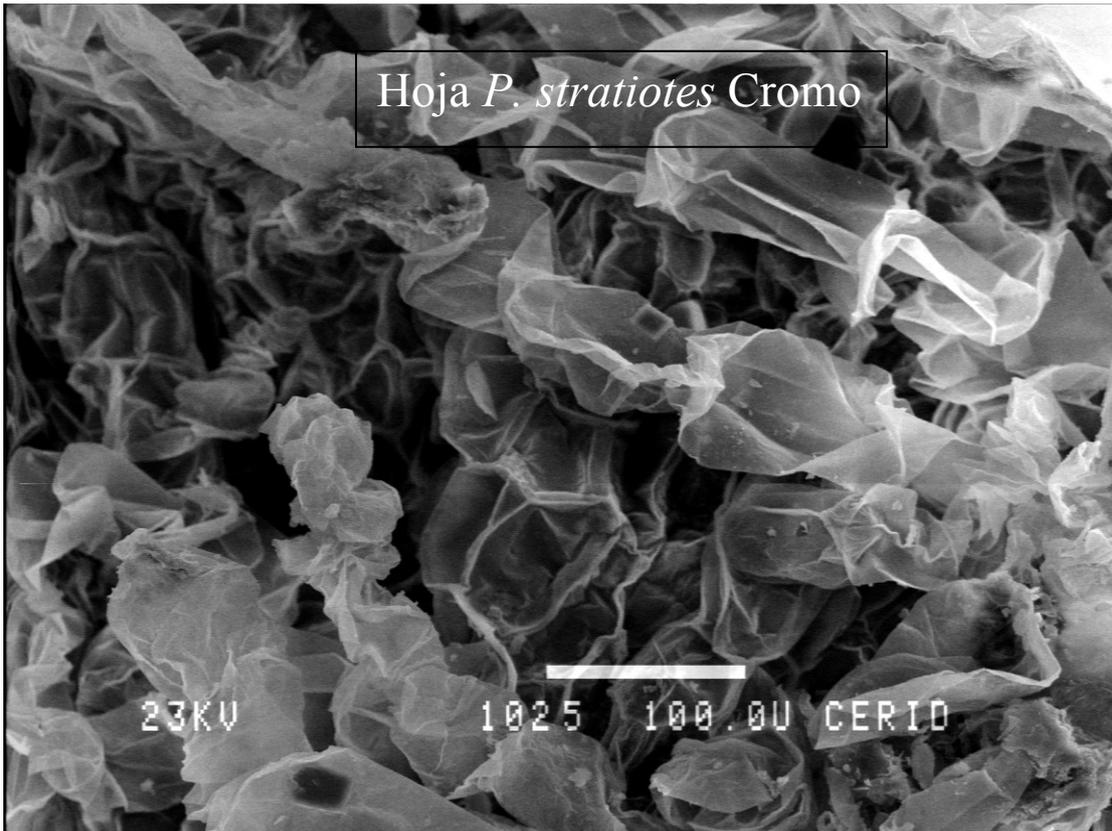
Espectro del análisis por Rayos X de los precipitados observados en la superficie de las raíces de *P. stratiotes* contaminadas con Cr(III).

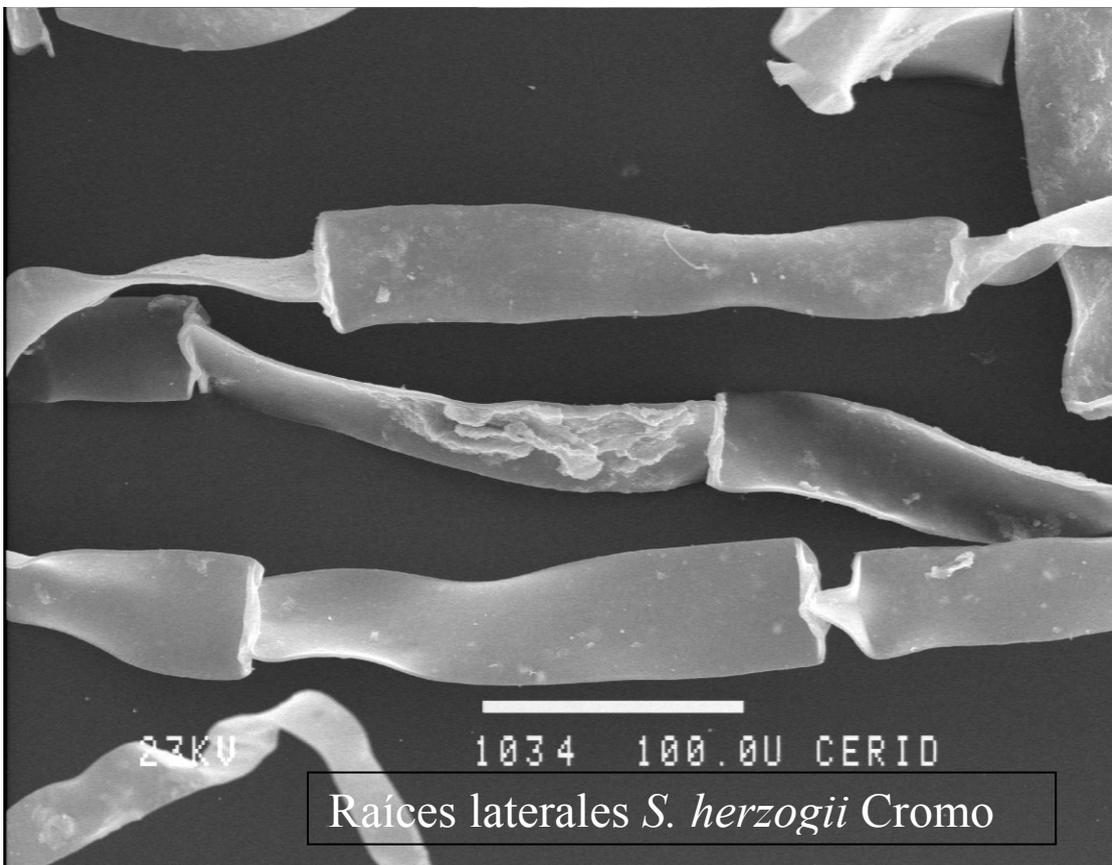
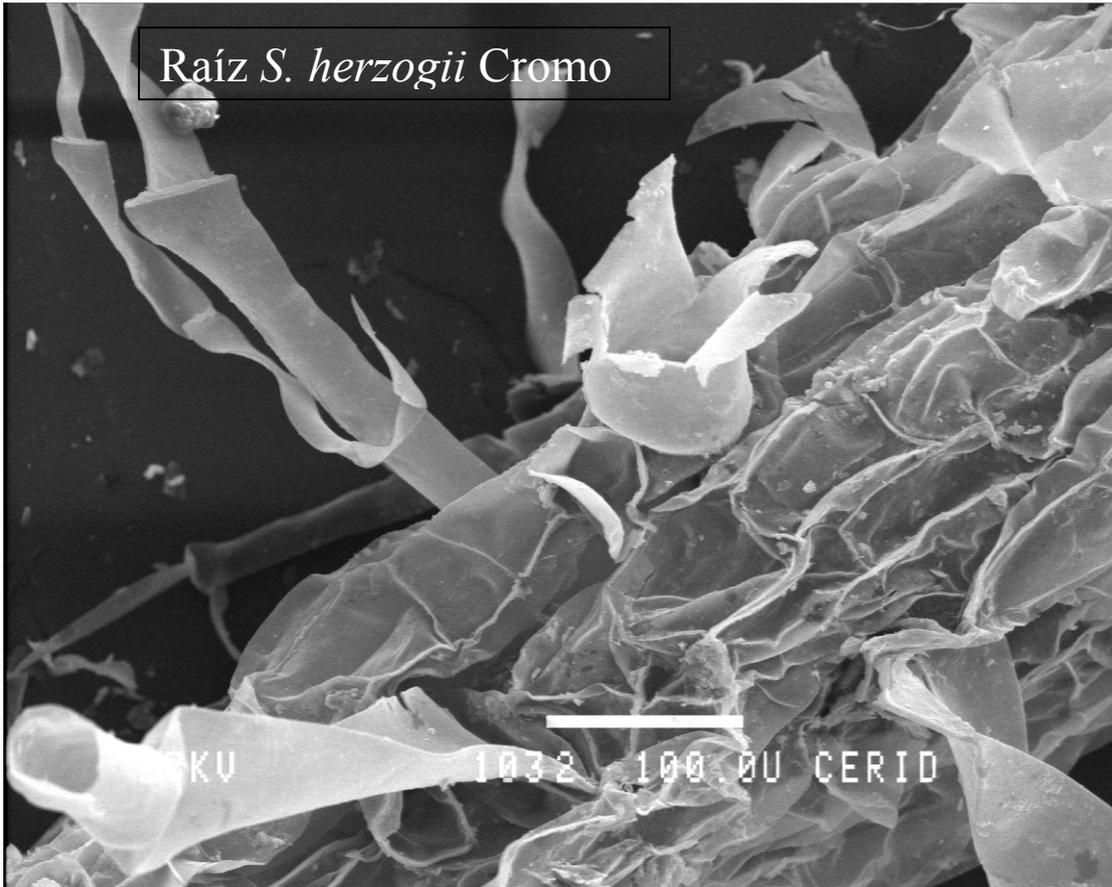


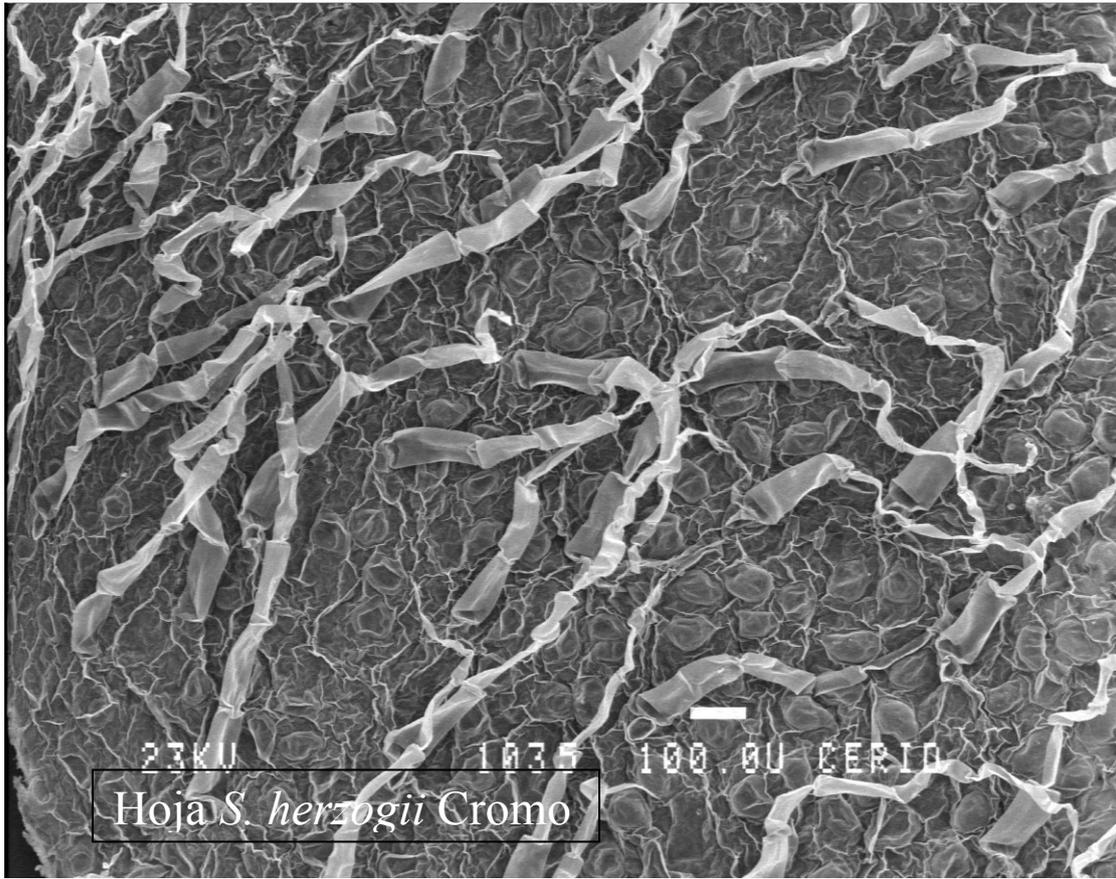
Anexo IV

Micrografías de Hojas y Raíces de *S. herzogii* y *P. stratiotes* contaminadas
con Cromo y Cadmio

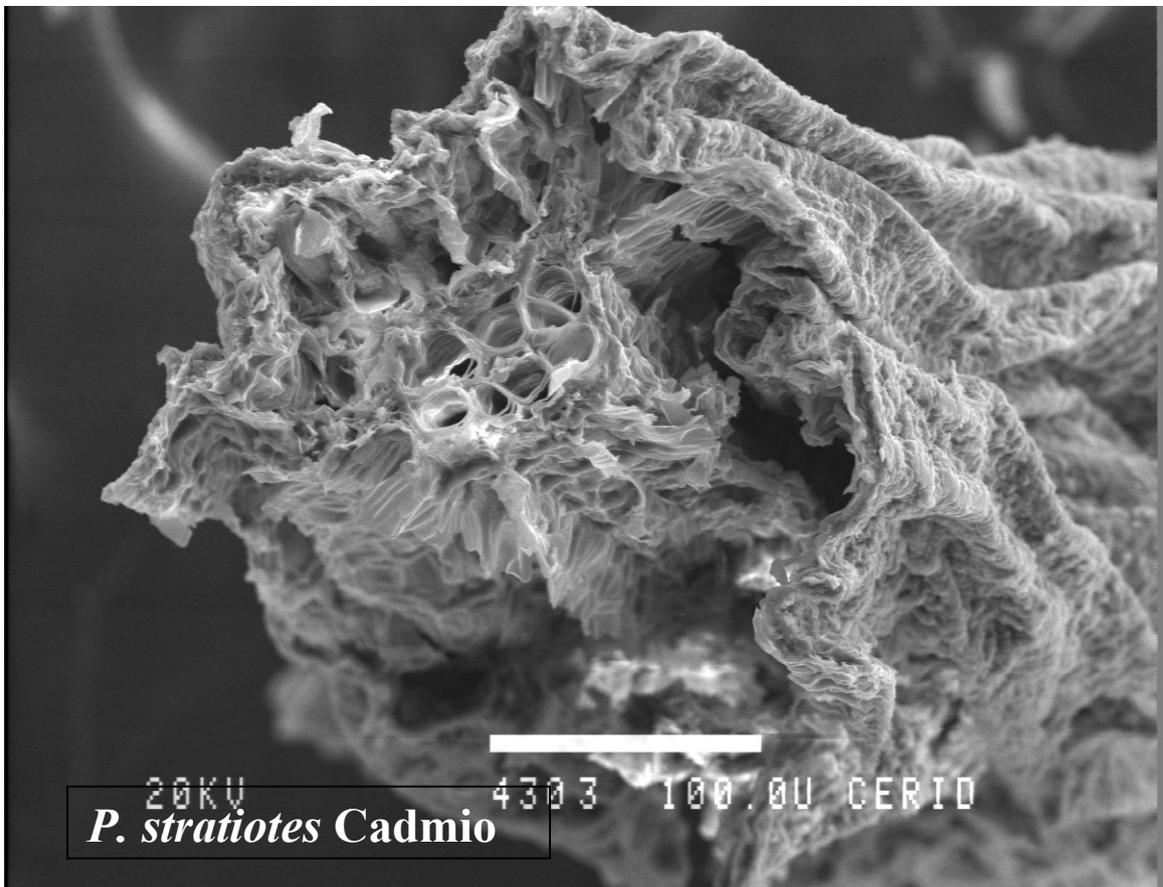
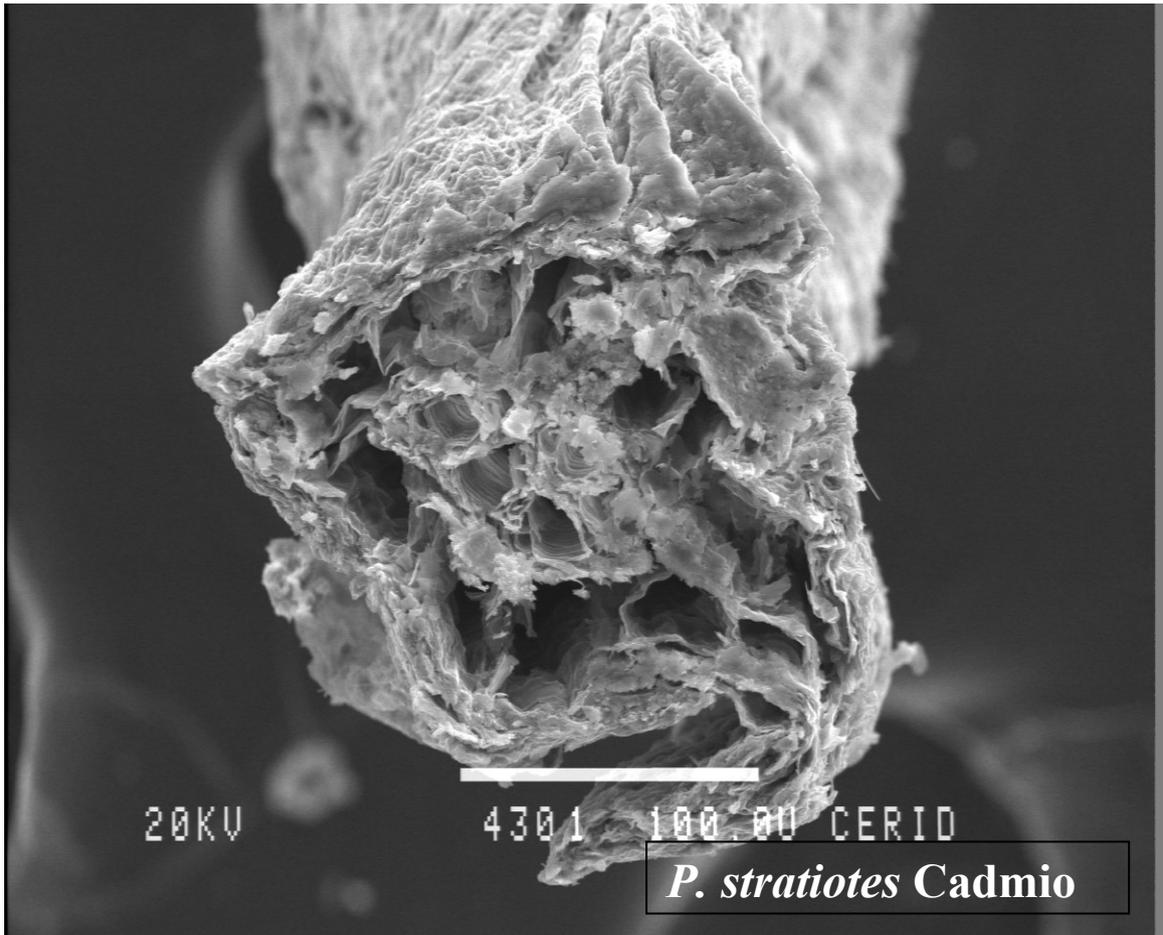


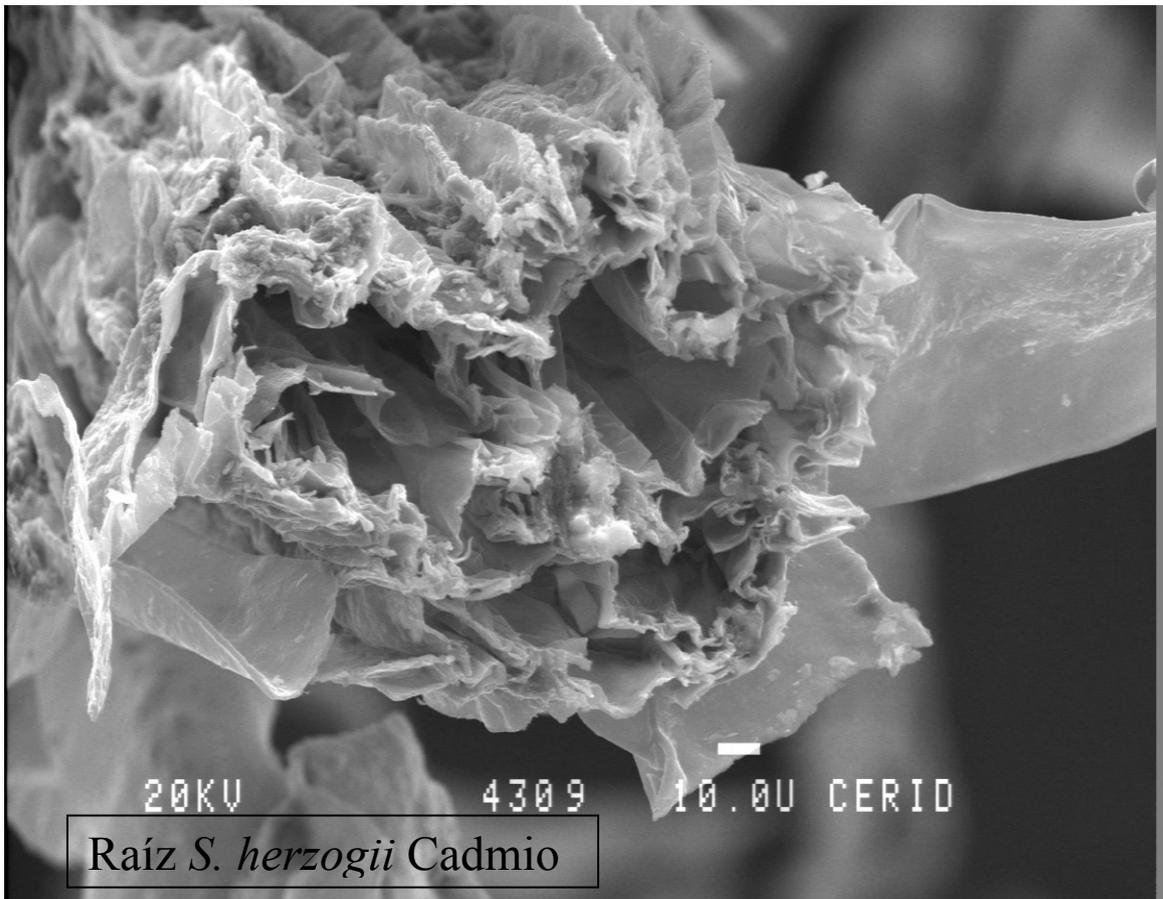
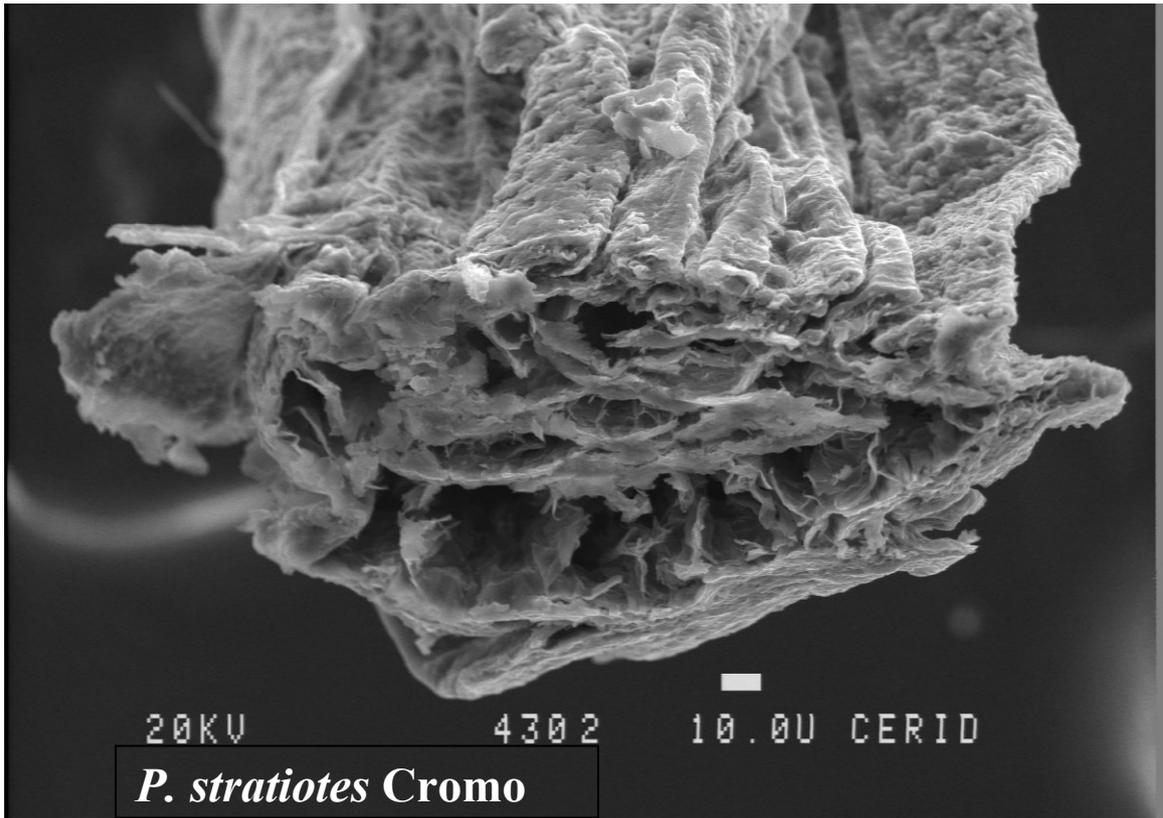


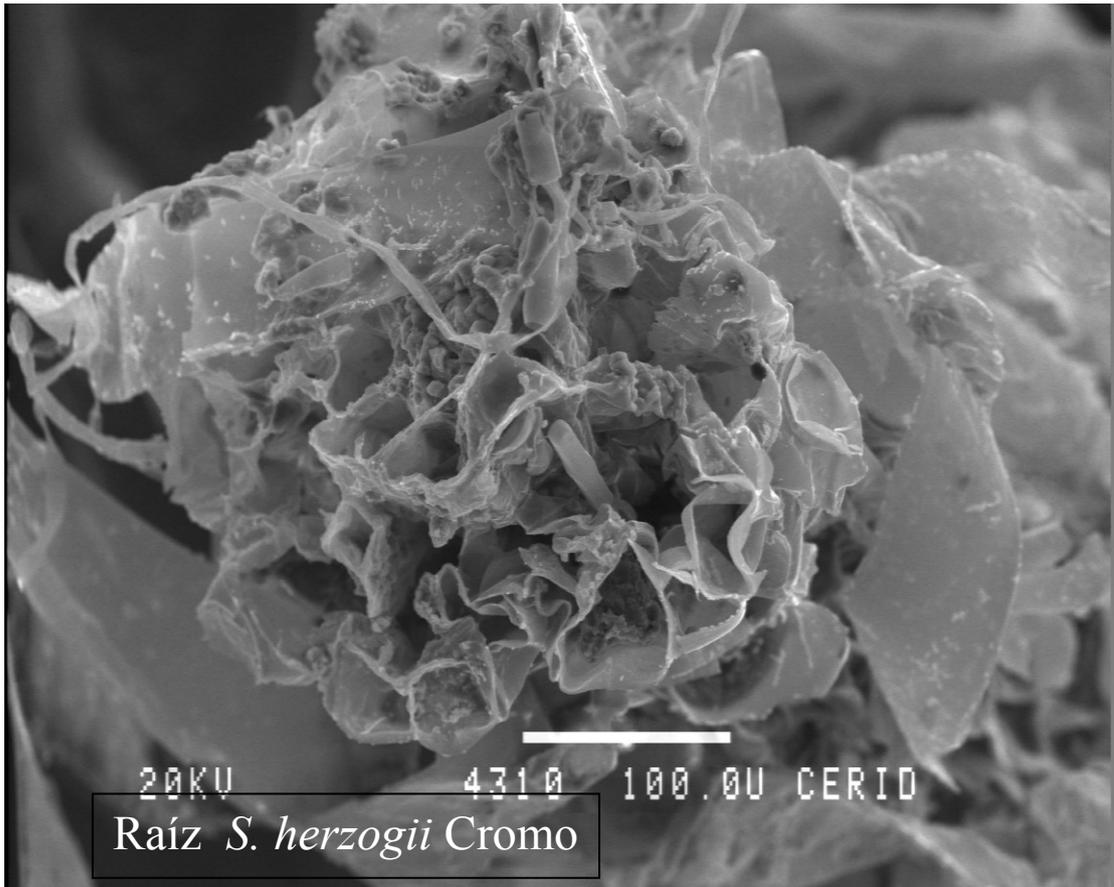




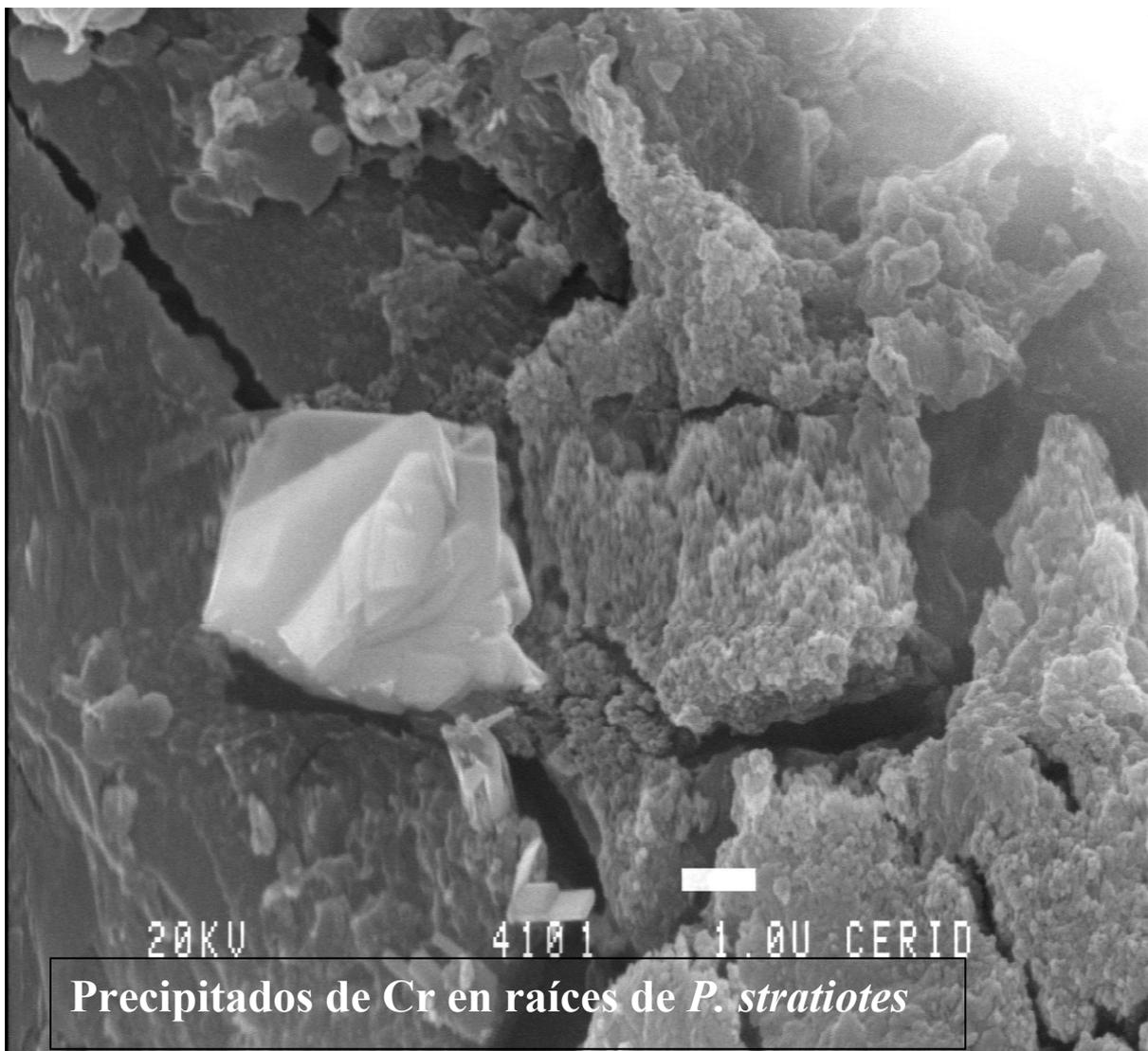
Cortes Transversales







Micrografía de los precipitados hallados en raíces de plantas de *P. stratiotes* expuestas a una solución de Cr(III).



ANEXO V

MONITOREO Y CONTROL DE LAS MUESTRAS MULTIVARIADAS

Se dividió el análisis en muestras de efluente de entrada al humedal (se denominó “Entrada”) y muestras de efluente que egresa del humedal (“Salida”). Se analizó primero el efluente de “salida”.

Salida:

Las variables tomadas para realizar el análisis fueron: Amonio, Conductividad, Cromo, DBO, DQO, Hierro, Níquel, Nitrato, Nitrito, oP, Oxígeno disuelto, pH, Ptotal, Sulfatos y Cinc.

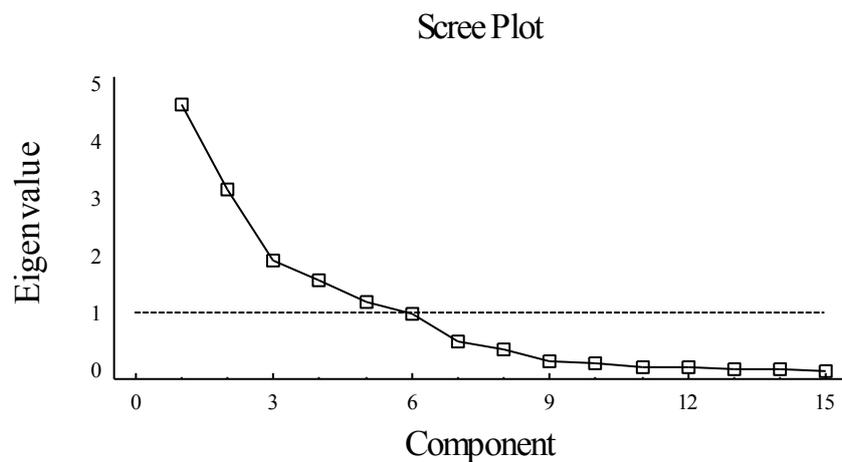
Número de observaciones: 18

Número de componentes extraídos: 5

Análisis por Componentes Principales

Componente	% de la	%	
Número	Autovalor	Varianza	Acumulado
1	4,67097	31,140	31,140
2	3,18664	21,244	52,384
3	1,94681	12,979	65,363
4	1,57004	10,467	75,830
5	1,22206	8,147	83,977
6	0,994239	6,628	90,605
7	0,509973	3,400	94,005
8	0,390017	2,600	96,605
9	0,180218	1,201	97,806
10	0,142648	0,951	98,757
11	0,0727213	0,485	99,242
12	0,0539449	0,360	99,602
13	0,0272382	0,182	99,783
14	0,019667	0,131	99,915
15	0,0128193	0,085	100,000

Si se grafican los autovalores en función de los componentes principales, se obtiene:



El Programa Statgraphycs propone, seleccionar o extraer componentes que tengan autovalores mayores a 1. De esta forma se deberían extraer 5 componentes principales. De

cualquier forma, y para poder graficar lo obtenido, solo se tendrán en cuenta los 3 primeros componentes que acumulan un 65,4 % de la varianza total.

Tabla de Coeficientes de los Autovectores

	Component 1	Component 2	Component 3
Amonio sal	0,39864	-0,103509	0,237826
Cond sal	0,195093	-0,41844	-0,220614
Cr sal	0,324033	0,0615909	-0,149305
DBO sal	0,332169	0,224681	-0,103426
DQO sal	0,236002	0,350579	0,178993
Fe sal	-0,110292	-0,227837	-0,047878
Ni sal	0,340868	0,100422	0,285421
Nitrato sal	0,283927	-0,257467	0,126161
Nitrito sal	0,241511	-0,215865	0,317104
oP sal	-0,0324882	-0,407762	0,168818
Oxig sal	-0,295669	-0,108281	0,385275
pH sal	-0,0532851	0,042601	0,49366
Ptotal sal	-0,0806081	-0,43335	0,173916
Sulfatos sal	0,144188	-0,301511	-0,422388
Zn sal	0,382223	-0,0601817	-0,0147162

Esta tabla muestra la ecuación de los componentes principales. Tomando únicamente los tres primeros:

$$Y_1 = 0,39864 * \text{Amonio sal} + 0,382223 * \text{Zn sal} + 0,340868 * \text{Ni sal} + 0,332169 * \text{DBO sal} + 0,324033 * \text{Cr sal} + 0,283927 * \text{Nitrato sal} + 0,241511 * \text{Nitrito sal} + 0,236002 * \text{DQO sal} + 0,195093 * \text{Cond sal} - 0,110292 * \text{Fe sal} - 0,0324882 * \text{oP sal} - 0,295669 * \text{Oxig sal} - 0,0532851 * \text{pH sal} - 0,0806081 * \text{Ptotal sal} + 0,144188 * \text{Sulfatos sal}$$

$$Y_2 = -0,103509 * \text{Amonio sal} - 0,0601817 * \text{Zn sal} + 0,100422 * \text{Ni sal} + 0,224681 * \text{DBO sal} + 0,0615909 * \text{Cr sal} + 0,350579 * \text{DQO sal} - 0,41844 * \text{Cond sal} - 0,227837 * \text{Fe sal} -$$

0,257467 *Nitrato sal -0,215865 *Nitrito sal - 0,407762 *oP sal - 0,108281*Oxig sal + 0,042601*pH sal - 0,43335 *Ptotal sal - 0,301511*Sulfatos sal

$Y_3 = 0,237826 * \text{Amonio sal} - 0,0147162 * \text{Zn sal} + 0,285421 * \text{Ni sal} - 0,103426 * \text{DBO sal} - 0,149305 * \text{Cr sal} + 0,178993 * \text{DQO sal} - 0,220614 * \text{Cond sal} - 0,047878 * \text{Fe sal} + 0,126161 * \text{Nitrato sal} + 0,317104 * \text{Nitrito sal} + 0,168818 * \text{oP sal} + 0,385275 * \text{Oxig sal} + 0,49366 * \text{pH sal} + 0,173916 * \text{Ptotal sal} - 0,422388 * \text{Sulfatos sal}$

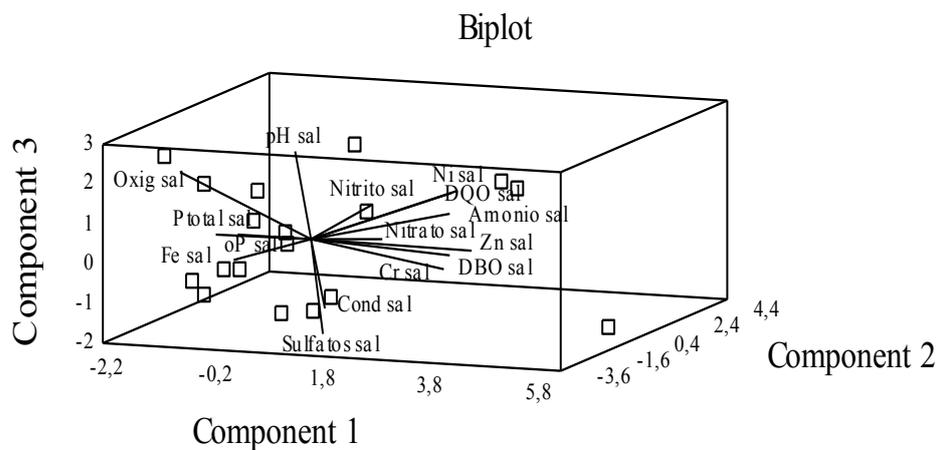
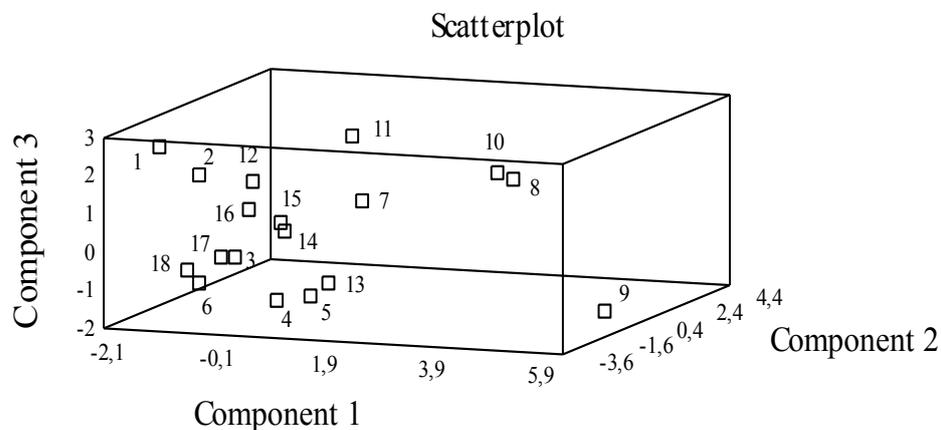
donde los valores de las variables en la ecuación están estandarizados sustrayendo su media y dividiendo por su desviación estándar.

Tabla de “Scores”

Row	Component 1	Component 2	Component 3
1	-2,03596	-1,86034	2,35779
2	-1,86786	-0,29366	1,31685
3	-1,28248	-0,083697	-0,809079
4	-0,312052	-0,59576	-1,76344
5	0,55374	1,33912	-1,45287
6	-0,657571	-3,59145	-0,690192
7	1,61845	-1,61654	1,19862
8	4,72913	-2,45564	2,15498
9	5,15557	0,983734	-1,99017
10	2,16567	3,78147	0,826432
11	-0,0104425	2,33374	1,91281
12	-1,51204	1,46052	0,813523
13	0,303656	0,241612	-1,4678
14	-0,716411	0,839152	-0,320569
15	-0,837203	1,0076	-0,102807
16	-1,56726	1,37804	0,0751595
17	-1,71667	0,345161	-0,951548
18	-2,01027	-0,534816	-1,10769

La primera de las siguientes gráficas, muestra la distribución de los distintos muestreos en el espacio de los componentes principales.

La segunda gráfica muestra además, el peso de cada variable en los tres componentes principales.



En este biplot puede verse que o-P y Ptotal toman muy parecidas direcciones en el espacio de componentes principales, es decir que están contribuyendo de la misma forma. Lo mismo se observa para Conductividad y Sulfato. De alguna forma esto sugiere que

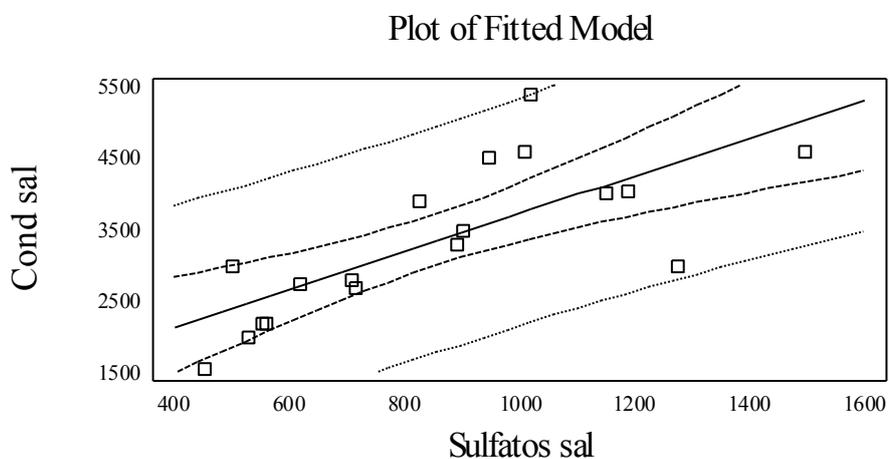
estas variables podrían estar correlacionadas. Para verificarlo se realiza un análisis por Regresión lineal para estos dos pares de variables.

Se obtuvo la siguiente ecuación del modelo fiteado:

$$\text{Cond sal} = 1094,29 + 2,63125 * \text{Sulfatos sal}$$

Ya que el valor p- en ANOVA es menor que 0.01, existe una relación estadísticamente significativa entre Conductividad y Sulfato con un nivel de confianza del 99 %.

El estadístico R-Squared indica que el modelo fiteado explica el 55,4997% de la variabilidad en conductividad. El coeficiente de correlación 0,744981 indica una moderadamente fuerte relación entre las variables.

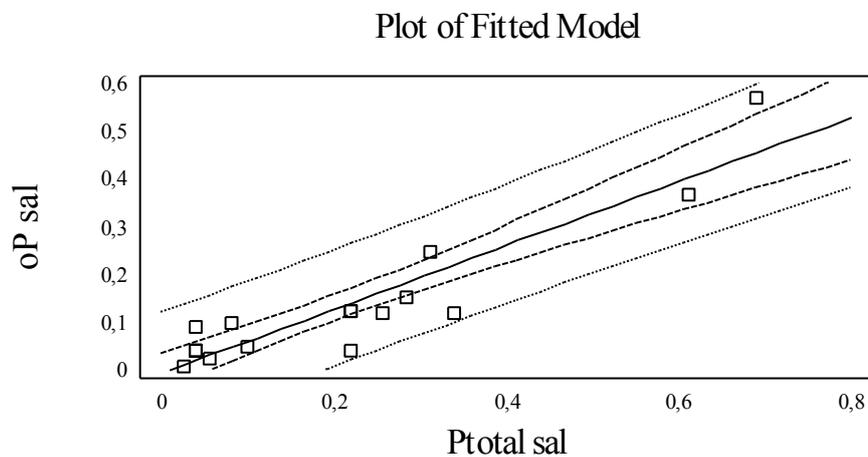


Para el otro par de variables se obtuvo:

$$\text{oP sal} = -0,00565643 + 0,668742 * \text{Ptotal sal}$$

Ya que el valor p- en ANOVA es menor que 0.01, existe una relación estadísticamente significativa entre Ptotal y o-P con un nivel de confianza del 99 %.

El estadístico R-Squared indica que el modelo fiteado explica el 85,4 % de la variabilidad en o-P. El coeficiente de correlación 0,924219 indica una fuerte relación entre las variables.



Este análisis permite eliminar dos variables: Sulfato y Ptotal.

Se vuelve a realizar el análisis por Componente Principales eliminando estas variables.

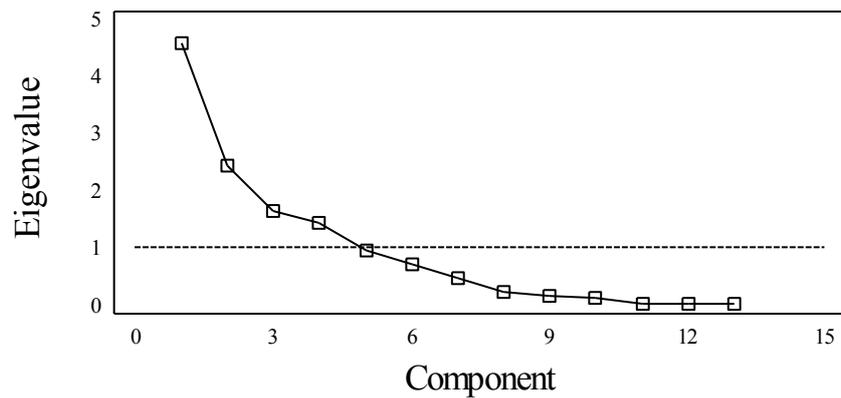
Variables: Amonio sal Cond sal Cr sal DBO sal DQO sal Fe sal Ni sal
Nitrato sal Nitrito sal oP sal Oxig sal pH sal Zn sal

Número de observaciones: 18; Número de componentes extraídos: 4

Principal Components Analysis

Component Number	Eigenvalue	Percent of Variance	Cumulative Percentage
1	4,57008	35,154	35,154
2	2,43491	18,730	53,885
3	1,67151	12,858	66,742
4	1,45842	11,219	77,961
5	0,981263	7,548	85,509
6	0,717693	5,521	91,030
7	0,498808	3,837	94,867
8	0,246299	1,895	96,761
9	0,173694	1,336	98,098
10	0,128757	0,990	99,088
11	0,0496569	0,382	99,470
12	0,0482943	0,371	99,841
13	0,0206071	0,159	100,000

Scree Plot



Los 3 primeros componentes principales explican el 66,7 % de la varianza total.

Tabla de Coeficientes de los Autovectores

	Component 1	Component 2	Component 3
Amonio sal	0,411362	-0,135869	0,194764
Cond sal	0,179209	-0,456315	-0,290922
Cr sal	0,324228	0,138256	-0,114257
DBO sal	0,332775	0,321965	-0,031828
DQO sal	0,252641	0,388103	0,195168
Fe sal	-0,119802	-0,178035	0,108196
Ni sal	0,35751	0,0371459	0,201443
Nitrato sal	0,289147	-0,383003	-0,0561739
Nitrito sal	0,244343	-0,346043	0,32628
oP sal	-0,0168345	-0,398209	-0,0367376
Oxig sal	-0,288571	-0,198837	0,439852
pH sal	-0,0386567	0,0293177	0,684508
Zn sal	0,385291	-0,0379246	0,00150553

De esta forma los tres componentes principales son:

$$Y_1 = 0,411362 * \text{Amonio sal} + 0,385291 * \text{Zn sal} + 0,35751 * \text{Ni sal} + 0,332775 * \text{DBO sal} + 0,324228 * \text{Cr sal} + 0,289147 * \text{Nitrato sal} + 0,252641 * \text{DQO sal} + 0,244343 * \text{Nitrito sal} + 0,179209 * \text{Cond sal} - 0,119802 * \text{Fe sal} - 0,288571 * \text{Oxig sal} - 0,0386567 * \text{pH sal} - 0,0168345 * \text{oP sal}$$

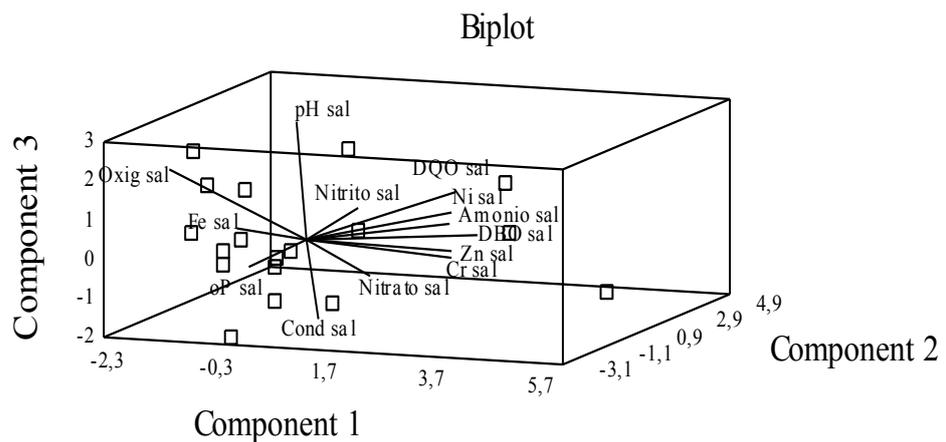
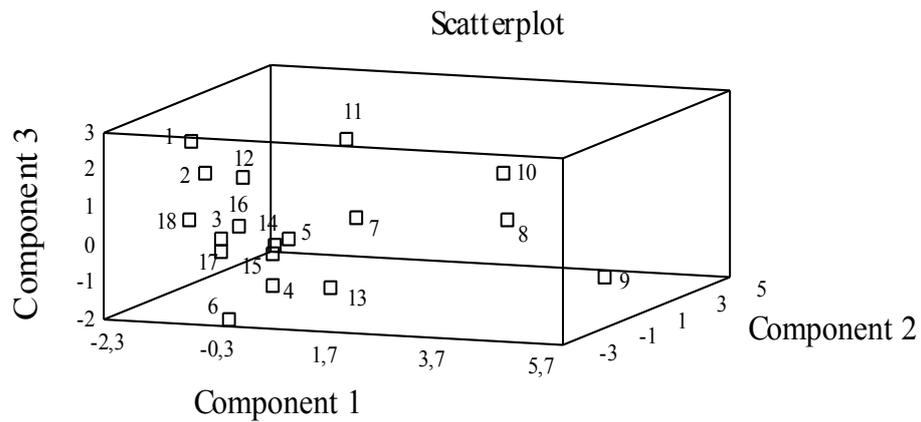
$$Y_2 = -0,135869 * \text{Amonio sal} - 0,0379246 * \text{Zn sal} - 0,346043 * \text{Ni sal} + 0,321965 * \text{DBO sal} + 0,138256 * \text{Cr sal} - 0,383003 * \text{Nitrato sal} + 0,388103 * \text{DQO sal} - 0,346043 * \text{Nitrito sal} -$$

$$0,456315 * \text{Cond sal} - 0,178035 * \text{Fe sal} - 0,198837 * \text{Oxig sal} + 0,0293177 * \text{pH sal} - 0,398209 * \text{oP sal}$$

$$Y_3 = 0,194764 * \text{Amonio sal} + 0,00150553 * \text{Zn sal} + 0,201443 * \text{Ni sal} - 0,031828 * \text{DBO sal} - 0,114257 * \text{Cr sal} - 0,0561739 * \text{Nitrato sal} + 0,195168 * \text{DQO sal} + 0,32628 * \text{Nitrito sal} + -0,290922 * \text{Cond sal} + 0,108196 * \text{Fe sal} + 0,439852 * \text{Oxig sal} + 0,684508 * \text{pH sal} - 0,0367376 * \text{oP sal}$$

Tabla de “scores”

Row	Component 1	Component 2	Component 3
1	-1,71829	-1,11953	2,35645
2	-1,73158	-0,307406	1,35537
3	-1,39668	-0,396175	-0,324013
4	-0,510813	-0,215764	-1,54335
5	0,117214	-1,13443	-0,0578111
6	-0,528111	-2,41201	-1,99733
7	1,61311	-1,8878	0,779033
8	4,79975	-2,9513	1,19554
9	4,94942	1,65682	-1,31019
10	2,34877	3,63661	0,860536
11	0,182811	1,56465	2,02097
12	-1,43407	0,753534	1,03595
13	0,25234	0,560835	-1,71011
14	-0,707848	0,41681	-0,615084
15	-0,727098	0,31034	-0,840824
16	-1,49698	0,712883	-0,269183
17	-1,77053	0,572051	-0,901012
18	-2,24141	0,239894	-0,0349448



En los gráficos puede observarse que las distintas observaciones tienen un lugar en el espacio de componentes principales. Cuando el proceso estuvo “bajo control” las observaciones se ubicaron cercanas al punto central [0,0,0]. Cuando se produjeron problemas operativos en el sistema (comienza en el muestreo 7 y 8, en la semana 9 se ubica y corrige el problema y en la semana 11 se reestablecen las condiciones “normales”), se observa un alejamiento de los puntos, el máximo es en la semana 9, y luego de corregido el problema, los puntos se ubican nuevamente cercanos al punto 0 de coordenadas. Este problema fue provocado por la falta de oxígeno disuelto en el agua del

humedal en la zona de salida. La falta de oxígeno provoca la liberación de o-P del sedimento y además la desnitrificación, por lo que se incrementan los niveles de o-P y NH_4^+ en el agua. Si observamos la ecuación del Componente 1, la variable que más influye es amonio (tiene el mayor coeficiente de autovalores), que al multiplicarlo por una elevada concentración de amonio, provocará el alejamiento desde el 0 de coordenadas a mayores valores sobre el eje del Componente 1. Esto lo observamos en los puntos 8, 9 y 10.

Para monitorear el funcionamiento del humedal se realizó una carta de control multivariado.

Carta de control

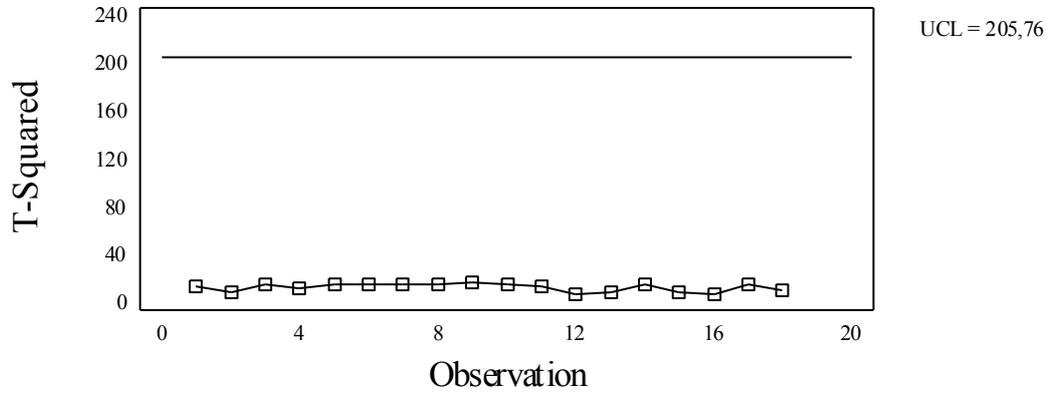
Número de observaciones = 18

0 casos excluidos

UCL: 205,762 para un $\alpha = 0,05$. El límite superior ha sido localizado para dar un 5% de falsas alarmas.

Ya que no hay casos por encima del límite, no se puede rechazar la hipótesis de que el proceso está en un estado de control estadístico con un nivel de confianza del 95 % .

Carta de control Multivariado



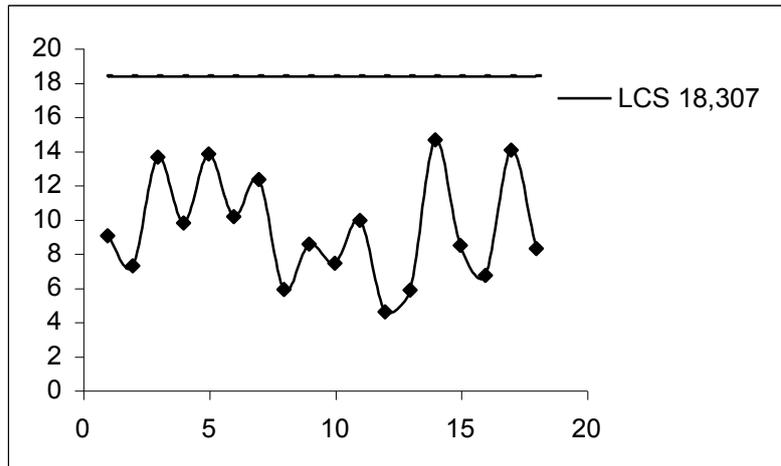
X = Excluidos * = Por encima del límite de 205,762

Observation	T-Squared
1	13,506
2	9,04527
3	14,1523
4	11,2477
5	14,3301
6	14,9835
7	14,6845
8	15,3254
9	16,0335
10	14,4843
11	13,351
12	5,90402
13	7,74112
14	15,0323
15	9,04282
16	7,43725
17	15,3095
18	9,38952

Se realiza también la gráfica de control de la parte no explicada por el modelo, es decir el error que se comete al considerar solamente 3 componentes principales.

Para ello se calculan los T_j^2 , teniendo en cuenta desde el 4° al 13° componente.

Obs	T_j^2
1	9,023096449
2	7,251345833
3	13,59816123
4	9,746425292
5	13,79650705
6	10,14648742
7	12,28847998
8	5,852165614
9	8,518885371
10	7,4027864
11	9,894742857
12	4,578773854
13	5,848409815
14	14,62496013
15	8,464625182
16	6,694816426
17	14,00346713
18	8,265853549

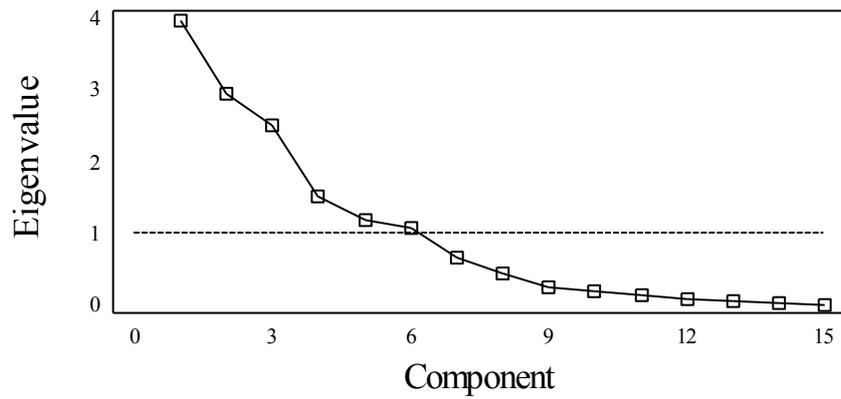


Como el LCS = 18.307 (χ^2 , 10, $\alpha = 0,05$), y no hay ningún punto por encima del límite, no se puede rechazar la hipótesis de que el proceso puede explicarse considerando únicamente los tres primeros componentes principales, con un nivel de confianza del 95 %

Efluente de entrada:

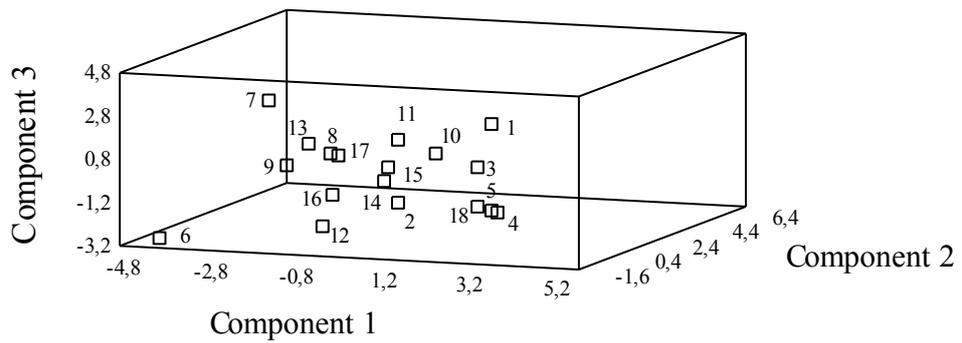
De igual forma se tratan los datos para el efluente de entrada. Primero teniendo en cuenta todas las variables.

Scree Plot

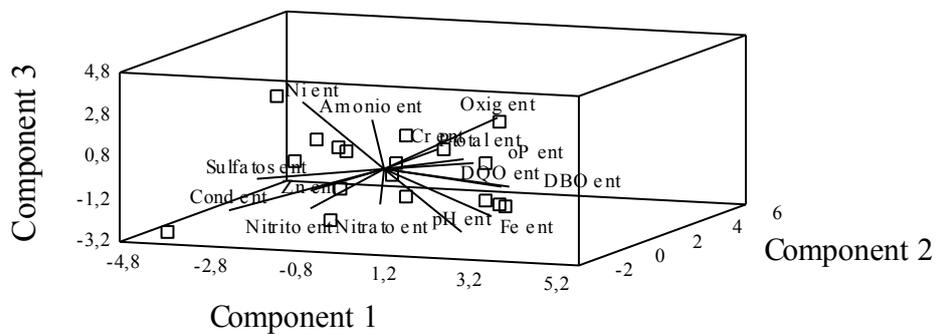


Si sólo se toman en cuenta los tres primeros componentes principales, para poder graficarlos e inferir alguna conclusión, se obtiene las siguientes gráficas.

Scatterplot



ENTRADA Biplot



Nuevamente aquí se observa que las contribuciones de sulfato y conductividad y las de o-P y Ptotal, siguen las mismas direcciones, es decir que contribuyen de igual forma, por lo que y al igual que con los datos de entrada se eliminan del análisis Sulfato y Ptotal.

Se realiza un nuevo análisis con 13 variables.

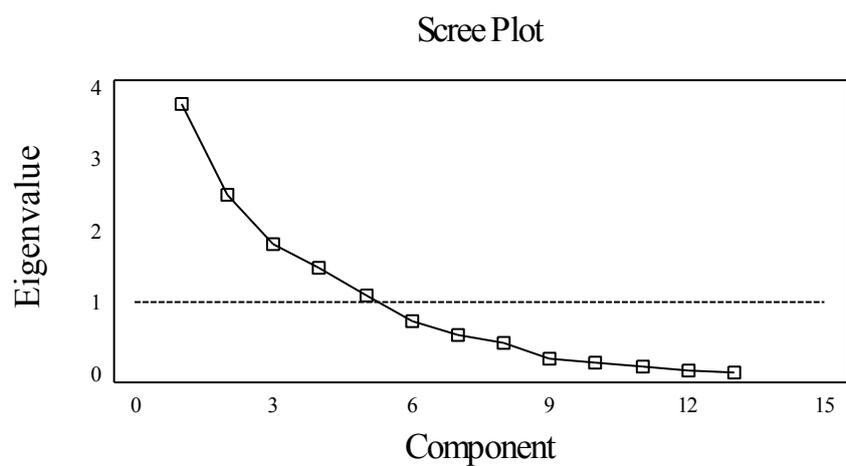
Variables: Amonio ent Cond ent Cr ent DBO ent DQO ent Fe ent Ni ent
 Nitrato ent Nitrito ent oP ent Oxig ent pH ent Zn ent

Número de observaciones:: 18

Número de componentes extraídos: 5

Principal Components Analysis

Component Number	Eigenvalue	Percent of Variance	Cumulative Percentage
1	3,77885	29,068	29,068
2	2,52396	19,415	48,483
3	1,81752	13,981	62,464
4	1,48038	11,388	73,852
5	1,09823	8,448	82,300
6	0,754347	5,803	88,102
7	0,561355	4,318	92,420
8	0,438309	3,372	95,792
9	0,221254	1,702	97,494
10	0,164911	1,269	98,762
11	0,098664	0,759	99,521
12	0,0462057	0,355	99,877
13	0,0160182	0,123	100,000



Tomamos nuevamente los 3 primeros componentes principales para poder graficarlos, los cuales acumulan un 62,4 % de la varianza total.

Tabla de pesos de componentes:

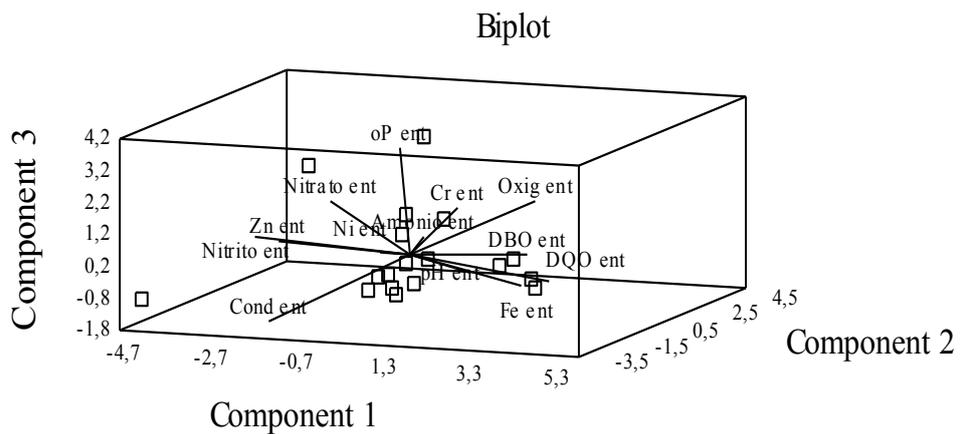
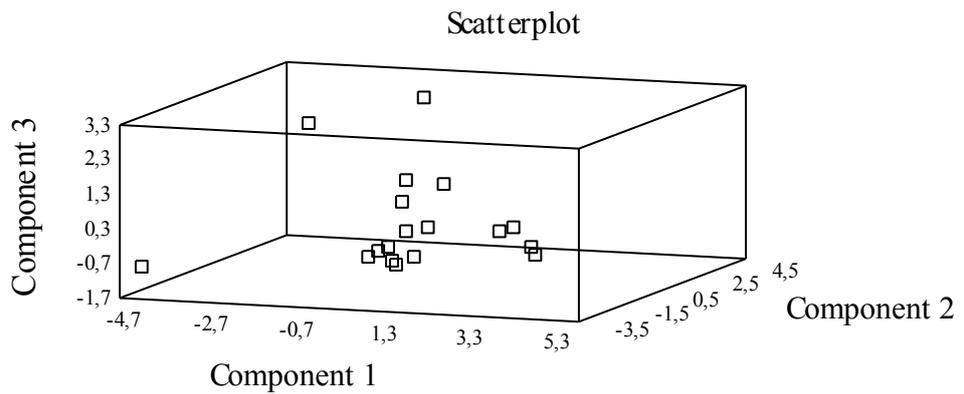
	Component 1	Component 2	Component 3
Amonio ent	-0,0833613	0,335196	-0,0124112
Cond ent	-0,290526	-0,319433	-0,36465
Cr ent	0,0840432	0,150136	0,261317
DBO ent	0,364325	-0,06028	0,0681913
DQO ent	0,422384	-0,0458603	-0,106058
Fe ent	0,414739	-0,247746	-0,0621796
Ni ent	-0,244739	0,429307	-0,167286
Nitrato ent	-0,132894	-0,266318	0,430019
Nitrito ent	-0,322599	-0,33253	0,20085
oP ent	-0,048762	0,0522845	0,672715
Oxig ent	0,216374	0,387349	0,23807
pH ent	0,311964	-0,366817	0,0474117
Zn ent	-0,300479	-0,206923	0,118798

Esta tabla muestra las ecuaciones de los componentes principales. Así el primer componente principal tiene la siguiente ecuación:

$$Y_1 = -0,0833613 \cdot \text{Amonio ent} - 0,290526 \cdot \text{Cond ent} + 0,0840432 \cdot \text{Cr ent} + 0,364325 \cdot \text{DBO ent} + 0,422384 \cdot \text{DQO ent} + 0,414739 \cdot \text{Fe ent} - 0,244739 \cdot \text{Ni ent} - 0,132894 \cdot \text{Nitrato ent} - 0,322599 \cdot \text{Nitrito ent} - 0,048762 \cdot \text{oP ent} + 0,216374 \cdot \text{Oxig ent} + 0,311964 \cdot \text{pH ent} - 0,300479 \cdot \text{Zn ent}$$

Tabla de scores

Row	Component		
	1	2	3
1	-0,492755	1,80626	3,17992
2	-1,55297	-1,70738	3,13829
3	2,13353	0,576216	-0,142961
4	2,66854	-1,29913	0,202637
5	3,35638	-1,02623	-0,499717
6	-4,61847	-3,49177	-0,802257
7	-2,12058	3,07919	-1,60908
8	-0,6301	0,987114	0,340001
9	-0,632235	0,516716	-1,22843
10	0,38206	0,866672	0,968686
11	-0,656185	1,27951	0,909816
12	0,0277038	-2,14025	-0,546551
13	-1,10257	1,27473	-1,0505
14	0,0546112	-0,309177	-0,162906
15	0,28943	0,315794	-0,179735
16	0,0001109	-0,755525	-1,05426
17	-0,279201	0,844628	-1,1555
18	3,1727	-0,817373	-0,307462



Es interesante resaltar que en el análisis para el efluente de entrada se observa que la reducción de datos es menor que para el efluente de salida. Esto puede deberse a la gran variabilidad que posee el efluente que ingresa al humedal. Satisfactoriamente se puede observar que la variabilidad no es tan grande en el efluente de salida, y se pueden hacer interpretaciones, tomando en cuenta solamente los tres primeros componentes principales.

BIBLIGRAFÍA

1. APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Amer. Publ. Health Assoc.*, N.Y., 1268.
2. Ahrland, S., Chatt, J. and Davies, N.R., 1958. The relative affinities of ligand atoms for acceptor molecules and ions. *Quarterly Review*. 12, 265-276.
3. Baran E.J., 1995. Química Bioinorgánica. McGraw-Hill/Interamericana de España.
4. Barceló, J., Ch. Ponschrieder y B. Gunsé, 1987. El Impacto del cromo en el medio ambiente. II. El Cr en los organismos vivos. *Cir. Far.*, 293: 31-48.
5. Barceló, J. and Poschneider, Ch., 1997. Chromium in plants. In *Chromium Environmental Issues*, Canali, S., tittarelli, F and Segui, P (eds) Franco Angeli, Italy, 102-109.
6. Bernard, A. & Lauwerys, R., 1984. Cadmium in human population. *Experientia*, 40(2):143-52.
7. Bollard, E.G., 1983. Involvement of unusual elements in plants growth and nutrition". En: A. Läuchli y R.L. Bielski (eds). *Inorganic plant nutrition*, pp. 495-744. Enciclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol 15 B Springer Verlag Berlin.
8. Boyd, C.E., 1970. Chemical analysis of some vascular aquatic plants. *Arch.Hydrobiol.*, 67:78– 85.
9. Bower, C.A., Gschwend, F.B., 1952. Ethylene glycol retention by soil organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1164-1166.
10. Brady D., Letebele B., Duncan, J.R. and Rose, P.D., 1994. Bioaccumulation of metals by *Scenedesmus*, *Selenastrum* and *Chlorella* algae. *WaterS.A.* 20, 213-218.

11. Brewster, M.D. and Passmore, R.J., 1994. Use of Electrochemical Ion Generation for Removing Heavy Metals from Contaminated Groundwater, *Environmental Progress*, 13(2):143-148.
12. Campos, J.; Martínez-Pacheco, M. and Cervantes, C., 1995. Hexavalent chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. strain. *Antonie van Leeuwenhoek* 68, 203–208.
13. Carpenter S R., 1986. Effects of submersed macrophytes on ecosystem process. *Aquat Bot*, 26:341-370.
14. Cervantes, C. and Silver, S., 1992. Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27, 65–71.
15. Cervantes, C.; Campos-García, J.; Devars, S.; Gutiérrez-Corona, F.; Loza-Tavera, H., Torrés-Guzmán, J. and Moreno-Sánchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 335-347.
16. Chang, E. , Bursztynsky, T., Hantzsche, N. y Litwin, Y.J., 1982. The use of wetlands for water pollution control. Municipal environmental Research Laboratory, USEPA-600/2-82-086.
17. Chandra, P. and Garg, P., 1992. Absorption and toxicity of chromium and cadmium in *Limnathemum cristatum* Griseb. *Sci. Total Environ.* 125, 175-183.
18. Cole, S., 1998. The emergence of treatment wetlands. *Environmental Science and Technology* 32: 218A-223A.
19. Coleman, R.N. and Paran, J.H., 1991. Biofilm concentration of chromium. *Environmental Technology* 12, 1079-1093.
20. Cutler, J.M. and Rains, D.W., 1974. Characterization of cadmium uptake by plant tissue. *Plant Physiol* 54: 67-71.

21. Czakó-Vér, K.; Batié, M.; Raspor, P.; Sipiczki, M. and Pesti, M., 1999. Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 109–115.
22. De Jonge, H.D., Mittlemeijer-Hazeleger, M.C., 1996. Adsorption of CO₂ and N₂ on soil organic matter: nature of porosity, surface area, and diffusion mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* 30, 408-413.
23. De Luis Calabuig, E., 2001. Experiencias de Tratamiento de Efluentes con macrófitas en España. Conferencia del Curso Internacional Tecnologías de Bajo Costo para el Tratamiento de efluentes Agroindustriales. LATU (Laboratorio Tecnológico del Uruguay). Montevideo, Uruguay, 2001.
24. de Wet, L.P.D., Schoonbee H.J., Pretorius J. and Bezuidenhout L.M., 1990. Bioaccumulation of selected heavy metals by the water fern, *Azolla filiculoides* Lam. in a wetland ecosystem affected by sewage, mine and industrial pollution. *Water SA* 16, 281-286.
25. Delgado, M., Bigeriego M. and Guardiola, E., 1993. Uptake of Zn, Cr and Cr by water Hyacinths. *Wat. Res.* 27 (2), 269-270.
26. Ding, X., Jiang, J., Wang, Y., Wang, W., Ru, B., 1994. Bioconcentration of cadmium in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in relation to thiol group content. *Environ. Pollution.* 84, 93-96.
27. Dombeck, G., Perry, M., Phinney, J., 1998. Mass balance on water column trace metals in a free-surface-flow-constructed wetland in Sacramento, California. *Ecol. Eng.* 10, 313-339.
28. Dunaway-Mariano D, Cleland W.W., 1980. Investigations of substrate specificity and reaction mechanism of several kinases using chromium(III) adenosine 5'-

- triphosphate and chromium(III) adenosine 5'-diphosphate. *Biochemistry*. Apr 1;19(7):1506–1515.
29. Dushenkov, V. P., Nanda Kumar, B. A., Motto, H. and Raskin, Y., 1995. Rhizofiltration: The use of Plants to remove Heavy Metals from Aqueous Streams. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1239-1245.
30. Ellis, J.; Shutes, R.; Revitt, D. y Zhang, T., 1994. Use of macrophytes for pollution treatment in urban wetlands. *Resour. Cons. & Recycl.* 11: 1-12.
31. Fendorf, S., 1995. Surface reactions of chromium in soils and waters. *Geoderma*, 67, 55-71.
32. Finegold, S and Baron, E., 1998. Diagnóstico microbiológico. *Editorial Panamericana*. Buenos Aires.
33. Fraústo Da Silva J.J.R., Williams R.J.P., 1993. The Biological Chemistry of the Elements. The inorganic chemistry of life. Clarendon Press. Oxford.
34. Fujita Masayuki, 1985. The Presence of Two Cd-Binding Components in the Roots of Water Hyacinth Cultivated in a Cd²⁺-Containing Medium. *Plant Cell Physiol.* 1985 26: 295-300.
35. Galil, N., and Rebhun, M., 1990. A Comparative Study of RBC and Activated Sludge in Biotreatment of Wastewater from an Integrated Oil Refinery. 44th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings, 1990, Chelsea, Michigan. 711-717.
36. Gersberg, R. M., Elkins, B.V., Lyon S.R and Goldman, C. R., 1986. Role of aquatic plants in wastewater treatment by artificial wetlands. *Wat. Res.* 20, 363-368.
37. Geckeler K.E. and Volchek, K., 1996. Removal of hazardous substances from water using ultrafiltration in conjunction with soluble polymers, *Environ. Sci. Technol.*, 30(3) 725–734.

38. Groten, J. P. , J. H. Koeman, J. H. J. van Nesselrooij, J. B. Luten, J. M. Fentener van Vlissingen, W. S. Stenhuis and P. J. van Bladeren, 1994. Comparison of renal toxicity after long-term oral administration of cadmium chloride and cadmium-metallothionein in rats. *Toxicological sciences* Volume 23, Number 4. Pp. 544-552.
39. Guo, T., R. Delaune and W. Patrick, 1997a. The effect of sediment redox chemistry on solubility/chemically active forms of selected metals in bottom sediment receiving produced water discharge. *Spill. Sci. Technol.*, 4: 165-175.
40. Guo, T., R. Delaune and W. Patrick, 1997b. The influence of sediment redox chemistry on chemically active forms of arsenic, cadmium, chromium and zinc in estuarine sediment. *Environ. Int.*, 23: 305-316.
41. Hadad, H.R., Maine, M.A., Bonetto, C.A., 2006. Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere*. 63, 1744-1753.
42. Hamelink, J.L., 1977. *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. Ed. F.L.Mayer & J.L. Hamelink. American Society for Testing and Materials, pp 149-161.
43. Hammer, D.A. and R.K. Bastion., 1989. Wetlands ecosystems : Natural water purifiers? Pp.5-20. In *Constructed wetlands for wastewater treatment*. D.A. Hammer, ed. Lewis publishers, Chelsea, Michigan.
44. Hopkins, L.L. Jr and Schwarz, K., 1964. Chromium (3) binding to serum proteins, specifically siderophilin. *Biochim Biophys Acta*. Sep 4;90:484-491.
45. Howden, R., Goldsbrough, P.B., Andersen, C.R., Cobbett, C.S., 1995. Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol*. 107: 1059-1066.
46. Hunt, R., 1978. *Studies in Biology N° 96*. Edward Arnold Ltd.Lond.: 12-16.

47. Ingole, N.W., Bhole, A.G., 2003. Removal of heavy metals from aqueous solutions by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *J. Water Serv. Res. Technol.* 52, 119-128.
48. Jana, S., 1988. Accumulation of Hg and Cr by three aquatic species and subsequent changes in several physiological and biochemical. *Water, Air Soil Poll.* 38, 105-109.
49. Jarvis, S. C., Jones, L. H. P. and Hopper, M. J., 1976. Cadmium uptake from solutions by plants and its transport from roots to shoots. *Plant and Soil* 44, 179-91.
50. Jenssen, P.D., Mahlum, T. and Krogstad T., 1993. Potential use of constructed wetlands for wastewater treatment in northern environments. *Wat. Sci. Technol.* 28, 149-157.
51. Kabata-Pendias, A, Pendias, H., 1984. Trace elements in soils and plants. CRC. Press Inc. Boca Raton, Florida.
52. Kagi, J.H.R. and Hapke, H.J., 1984. Biochemical interactions of mercury, cadmium and lead. In: Nriagu JO (ed) *Changing metal cycles and human health*. Springer-Verlag, Berlin, pp 237-250.
53. Kaim W., Schwederski B., 1994. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry Life*. John Wiley & Sons, New York.
54. Kamal, M., Ghaly, A.E., Mahmoud, N., Côté, R., 2004. Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environ. Int.* 29, 1029-1039.
55. Kleiman, I.D. and Cogliatti D.H., 1998. Chromium removal from aqueous solutions by different plant species. *Environmental Technology* 19, 1127-1132.
56. Li, J., Perdue, E.M., Gelbaum, L.T., 1998. Using cadmium-113 NMR spectrometry to study metal complexation by natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, 32:44, 483-487.

57. Losi, M.E., C. Amrhein, y W.T. Frankenberger. 1994. Environmental biochemistry of Chromium, *Rev Environ Contam Toxicol*: 136, 91-131.
58. Lovley, D.R., 1993. Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 263–290.
59. Lyon, G.L.; Peterson, P.J.; Brooks, R.R., 1969(a) . Chromium-51 transport in the xylem sap of *Leptospermum scoparium* (Manuka). *New Zealand J. Sci.* 12: 541-545.
60. Lyon, G.L., Peterson, P.J. and Brooks, R. R., 1969 (b). Chromium-51 distribution in tissues and extracts of *Leptospermum scoparium* . *Plant and Soil* 29, 225-240.
61. Lytle, C. M., Lytle, F. W., Yang, N., Quian, J. H., Hansen, D., Zayed, A. and Terry, N., 1998. Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by wetland plants: Potential for in situ heavy metal detoxification. *Environm. Sci. Technol.* 32, 3087-3093.
62. Mac Faddin, J.F., 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. *Editorial Panamericana*. Buenos Aires.
63. MacFarlane, G. R. y Burchett, M. D., 2000. Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Aquat. Bot.* 68: 45-59.
64. Maine, M.A., Panigatti, M.C & M.J: Pizarro. 1998. Role of macrophytes in phosphorus removal in Parana medio wetlands. *Polskie Archiwum Hydrobiologii* (Polish Archives of Hydrobiology), Vol. 45, N^o 1, 23-34.
65. Maine, M. A. ; N.L. Suñe, M.C. Pedro y M.V.Duarte., 1999. Eliminación de Cd y Cr en Aguas Utilizando Macrofitos. *Información Tecnológica* 10, 11-18.
66. Maine, M.A. Duarte, M.V. and Suñe, N.L, 2001. Cadmium Uptake By *Pistia Stratiotes*. *Water Res.* 35,11, 2629-2634.

67. Maine, M.A., Suñe, N.L. and Lager, S.C., 2004. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Res.* 38: 1494-1501.
68. Maine, M. A.; Suñe, N.; Hadad, H.; Sánchez, G. and C. Bonetto., 2007. Removal efficiency of a constructed wetland for wastewater treatment according to vegetation dominance. *Chemosphere.* 68:1105–1113.
69. Markus, J. and Kertes, A.S., 1969. Ion exchange and solvent extraction of metal complexes. Wiley . New York.
70. McGrath, S.P. and Smith, S., 1990. Chromium and nickel. In: *Heavy Metals in Soils* (Alloway; B.J., Ed), pp 125-150. Wiley, New York.
71. Martin, M.H. and Coughtrey, P.J., 1982. Biological monitoring of heavy metal pollution. Applied Science Publishers, London.
72. Mehrdad, L.; Peterson, P. J., 1979. Chromium acumulation and distribution in crop plants. *J.Sci.Food and Agric. London* 30: 136-142.
73. Miretzky, P., Saralegui, A., Fernández Cirelli, A., 2006. Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes. *Chemosphere.* 66(2), 247-254.
74. Mitchell, D. S. 1978. Aquatic Weeds in Australian Inland Waters. Australian Government Publishing Service. Canberra, Australia.
75. Mocchiutti, P y Zanuttini, M., 2002. Congreso Iberoamericano se Investigación en Celulosa y Papel-CIADICyP.
76. Murphy, J., Riley, J., 1962. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta.* 27, 31-36.
77. Nies, D.H. (1992). Resistance to Cd, Co, Zn, and Ni in Microbes. *Plasmid* 27, 17.

78. Ohtake, H., Fujii, E. and Toda, K., 1990. Reduction of toxic chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *Environmental Technology* 11, 663-668.
79. Ohtake, H. and Silver, S., 1994. Bacterial detoxification of toxic chromate. *In: Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals (Chaudhry, G.R., Ed.)*, 403–415. Dioscorides, Portland, OR.
80. Paknikar, K.M. and Bhide, J.V., 1993. Aerobic reduction and biosorption of chromium by a chromate resistant *Aspergillus* sp. *In: Biohydrometallurgical Technologies (Torma, A.E., Apel, M.L. and Brierley, C.L., Eds.)*, 237–244. The Minerals, Metals and Materials Society, Warrendale, PA.
81. Pearson, R.G., 1963. Hard and soft acids and bases. *J. Amer. Chem. Soc.*, 85. 3533-3539.
82. Perdomo S., C. Bangueses, J. Fuentes, J. Castro, H. Acevedo y C. Michelotti, 2001. Constructed wetland: a more suitable alternative for wastewater purification in uruguayan dairy processing industry. 7th Int. Conf. On Wetland Systems for Wat.Poll. Cont., IAWQ, Proc. 1407-1415. Florida. USA.
83. Pitt, J.I. and Hocking, A.D., 1997. Fungi and Food Spoilage. *Blackie Academic & Professional*. Second Edition. U.K.
84. Prakash, O., Mehroira, I. and Kumar, P., 1987. Removal of Cadmium from water by water hyacinth. *J. Environ. Engineering*. 113, 352-365.
85. Ramírez-Ramírez, R., Calvo-Méndez, C., Avila-Rodríguez, M. and Gutiérrez-Corona, J.F., 2000. Chromate resistance and reduction in a yeast strain isolated from industrial waste discharges. *In: Environmental Engineering and Health Sciences, Section 4: Environmental Engineering Application (Raynal, J.A., Nuckols, J.R., Reyes,*

R. and Ward M., Eds.), 437–445. Water Resources Publication, LCC, Englewood, CO, USA.

86.Reddy, S., 1983. Agroclimatic clasification of semi arid tropics. II Identification of clasificatory variables - Agric. Meteorol. - Volumen 30- 201-219. Holanda.

87.Ribeiro, T.H., Amaral, S.G., Rubio, J., Smith, R.W., 1998. Sorption of oils onto dry aquatic plant biomass. In: Paamehmetolu, A.G., Özgenolu, A. (Eds), Environmental Issues and Waste Management in Energy and Mineral Production. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 423-427.

88.Ruthven, D. M., Kaul, B.K. 1993. Adsorption of aromatic hydrocarbons en NaX zeolites. 1. Kinetics. *Ind. Eng.Chem. Res.* 32, 2053-2057.

89.Salt, D. E., I. J. Pickering, R. C. Prince, D. Gleba, S. Dushenkov, R. D. Smith, and I. Raskin, 1997. Metal Accumulation by Aquacultured Seedlings of Indian Mustard. *Environmental Science and Technology*, Volume 31, No. 6. p. 1636 - 1644.

90.Satkyala, G. and Kaiser, J., 1997. Studies on the effect of heavy metals Pollution on *Pistia stratiotes L.*(Water Lettuce)*Indian J. Environ. Hlth.* 39, 1-7.

91.Schneider, I.A.H., 1995. Biossorçao de Metais Pessados com a Biomassa de Macrófitos Acuáticos, PhD Thesis, Universidade Federal do Ríó Grande do Sul, Porto Alegre RS Brasil.

92.Schneider, I.A.H., Rubio, J., Misra, M., Smith, R.W., 1995. Stems and roots of *Eichhornia crassipes* as biosorbents for heavy metal ions. *Miner. Eng.* 8, 979-988.

93.Schneider, I. and Rubio, J., 1999. Sorption of heavy metal ions by the nonliving biomass of freshwater macrophytes. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2213-2217.

94. Schneider, I.A.H., Rubio, J., Smith, R.W., 2001. Biosorption of metals onto plant biomass: exchange adsorption or surface precipitation? *Int. J. Miner. Process.* 62, 111-120.
95. Schoeder, H.A., 1973. Trace Elements and Man, p. 171. Devin-Aldair, Old Greenwich, Conn.
96. 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.
97. Sen, A.K., N.G. Mondal and S. Mandal., 1987. Studies of uptake and toxic effects of Cr(VI) on *Pistia stratiotes*. *Wat.Sci.Technol.* 19; 119-127.
98. Shen, H. and Wang. Y.T., 1993. Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3771.
99. Skeffington, R.A., Cegrí, P.R., Peterson, P.J., 1976. Chromium uptake and transport in barley seedling (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 132: 209-214.
100. Silver, S. and Williams, J.W., 1984. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 531-537.
101. Soltan, M.E., Rashed, M.N., 2003. Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metals concentrations. *Adv. Environ. Res.* 7, 321-334.
102. Tiffin, L.O., 1972. Translocation of micronutrients in plants. En: *Micronutrients in agriculture*, pp. 199-229. *Soil Sic. Soc. America Inc.*, Madison.
103. Turick, C.E.; Apel, W.A.; Carmiol, N.S., 1996. Isolation of Hexavalent Chromium Reducing Bacteria from contaminated and noncontaminated environments. *Appl. Environ. Biotechnol.* 44, pp. 683.

104. Vajpayee, P.; Sharma, S.C.; Tripathi, R.D.; Rai, U.N. and Yunus, M., 1999. Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera*. Gaertn. *Chemosphere* 39, pp. 2159-2169.
105. Vesk, P., Allaway, W., 1999. Spatial variation of copper and lead concentrations of water hyacinth plants in a wetland receiving urban run-off. *Aquat. Bot.* 59, 33-44.
106. Vogeli-Lange, R and Wagner, G.J., 1990. Subcellular localization of cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implications of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Phys.* 92: 1086-1093.
107. Walpole, R. and Myers, R., 1999. Probability and Statistics for Engineers and Scientists. *McMilliam Publishing Company* 4 Ed.. p 797.
108. Wakatsuki, T., 1995. Metal oxidoreduction by microbial cells. *J. Ind. Microbiol.*, 14, 169–177.
109. Wang, P.; Mori, T.; Komori, K.; Sasatsu, K.; Toda, K. and Ohtake, H., 1989. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1665–1669.
110. Wang, G.X., 1995. Biosorption of Heavy Metal Iron from Aqueous Solution by Non-Living Water Hyacinth Roots, PhD Thesis, University of Nevada, Reno, Reno, N.V.
111. Weigel, H.J. and Jager, H.J., 1980. Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean plants. *Plant Physiology*, 65, 480-2.

112. Westlake, D.F., 1974. Macrophytes. In: R.A. Vollenweider (Ed.), A Manual on Methods for Measuring Primary Production in Aquatic Environments, IBP Handbook N° 12, 2nd ed., International Biological Programme, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 32-42. .
113. Wetzel, R. G. & Corners, H., 1979. The role of the littoral zone and detritus in lake metabolism. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 13: 145-161
114. Wójcik, M.; Vangronsveld, J.; D'Haen y Tukiendorf, A., 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Exp. Bot.* 53: 163-171.
115. Wolverton, B. C. and Mc Donald, R. C., 1979. The water hyacinth: from prolific Pest to potential provider. *Ambio* 8 (1) 2-9.