

## Evaluación de macrófitas autóctonas de flotación libre para su empleo en el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados

Wilfredo Tello Zevallos<sup>1</sup>, Dana Belén Loureiro<sup>1</sup>, María Cecilia Reeves<sup>1</sup>; Fabiana Yujnovsky<sup>1</sup>, Lucas Matías Salvatierra<sup>1,2</sup>, Leonardo Martín Pérez<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Química e Ingeniería del Rosario, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA-campus Rosario), Av. Pellegrini 3314 (2000) Rosario, Argentina.

<sup>2</sup> Instituto de Físicoquímica Teórica y Aplicada (INIFTA, UNLP-CONICET), Diag. 113 y 64 (1900) La Plata, Argentina.

<sup>3</sup> Instituto de Química Rosario (IQUIR, UNR-CONICET), Suipacha 570 (2000) Rosario, Argentina.

lucas\_salvatierra@uca.edu.ar // leonardoperez@uca.edu.ar

**Resumen.** Los sistemas basados en la utilización de plantas para el tratamiento de sitios contaminados (fitorremediación) han demostrado ser altamente eficientes para eliminar diferentes sustancias, en especial, metales pesados. El abanico de especies vegetales que se utilizan en procesos de fitorremediación es en general reducido y principalmente se restringe a especies helófitas o emergentes. Sin embargo, en sistemas de tratamiento estrictamente acuático y de gran caudal es adecuado el empleo de plantas de flotación libre. Para que un proceso de biorremediación sea propicio y sostenible es esencial que las especies vegetales que se empleen en su diseño no sólo sean eficientes en la remoción de los contaminantes a tratar, sino abundantes en la zona, de fácil acceso y no demanden condiciones especiales de cultivo. Considerando estas premisas, en este trabajo nos propusimos evaluar diferentes macrófitas acuáticas autóctonas oriundas de la zona del río Paraná Medio en su capacidad de crecimiento y adaptación a condiciones de cultivo en laboratorio, con el objetivo de estudiar posteriormente su potencial para depurar metales pesados. De las diferentes especies pre-seleccionadas, sólo *Salvinia biloba* Raddi (*Salvinia herzogii*) demostró una amplia capacidad de adaptación y reproducción en condiciones de invernadero. Posteriormente, se evaluó su capacidad como fitodepuradora de plomo ( $Pb^{2+}$ ), sobre muestras de agua contaminadas artificialmente con distintas concentraciones del metal y a diferentes tiempos de exposición, demostrando una alta eficiencia en la eliminación de este contaminante. Adicionalmente, se calculó el factor de bioconcentración (FBC) indicando que *S. biloba* es una especie hiperacumuladora de  $Pb^{2+}$ . Nuestros resultados sugieren que la incorporación de esta macrófita en el diseño de sistemas de tratamiento de efluentes industriales contaminados con metales pesados podría ser una estrategia exitosa para favorecer la remoción de estos contaminantes por procesos de biorremediación.

**Palabras clave:** efluentes industriales; metales pesados; plomo; fitorremediación; *Salvinia biloba* Raddi.

**Abstract.** Plant-based systems for the treatment of contaminated environments (phytoremediation) have proven to be highly efficient in removing different substances, especially heavy metals. The range of plant species that are used in phytoremediation processes is generally reduced and is mainly restricted to helophytes or emerging species. However, in strictly aquatic and high-flow treatment systems, the use of free floating plants could be more adequate. For a treatment system based on phytoremediation strategies be propitious and sustainable it is essential that the plant species used in the design are not only efficient in pollutants removal, but also abundant at the region, easily accessible and do not require special culture conditions. Considering these, at the present work we firstly evaluate different autochthonous aquatic macrophytes obtained from Paraná River in its capacity to growth, adapt and reproduce at laboratory «indoor» conditions. Later, we study plants potential to remove heavy metals from artificially-contaminated water samples. From the different pre-selected species, only *Salvinia biloba* Raddi (*Salvinia herzogii*) showed a wide capacity of adaptation and reproduction in greenhouse conditions. Moreover, *S. biloba* lead ( $Pb^{2+}$ ) removal capacity was also evaluated using water samples contaminated with three different metal concentrations and at different exposure times, demonstrating a high efficiency in the pollutant elimination for this plant. Additionally, the bioconcentration factor

(BCF) calculated for  $Pb^{2+}$  indicates that *S. biloba* could be considered as a metal hyperaccumulator plant. Our results suggest that incorporation of these macrophytes in wastewater treatment systems design could be a successful strategy to efficiently remove heavy metals by bioremediation processes.

**Key words:** industrial wastewater; heavy metals; lead; phytoremediation; *Salvinia biloba* Raddi.

## INTRODUCCIÓN

La aplicación de la biotecnología a la remediación de sitios contaminados es un campo de continuo desarrollo. En especial, el empleo de plantas para procesos de biorremediación (fitorremediación) ha sido ampliamente estudiado. Esta tecnología constituye una estrategia muy interesante debido a la capacidad que tienen ciertas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes, entre ellos, metales pesados (Prasad, 2003; Rai, 2008). Una de sus mayores ventajas es que las plantas pueden ser utilizadas como bombas extractoras de bajo costo para depurar aguas contaminadas, siendo un método apropiado para remediar grandes superficies o para finalizar la descontaminación en plazos de tiempo más largos (Sharma y Pandey, 2014).

La contaminación de aguas naturales por la liberación de grandes volúmenes de efluentes acuosos conteniendo metales pesados ha ido en aumento conforme a la actividad antropogénica y la industrialización. Debido a que la mayoría de los metales pesados son inertes a la degradación química o biológica, pueden permanecer indefinidamente en el ambiente siendo susceptibles a la transferencia en la cadena trófica suponiendo un grave riesgo para los seres vivos (Ali y col., 2013). En particular, el  $Pb^{2+}$  es uno de los metales pesados más abundantes y más ampliamente distribuido en el ambiente, además de ser un reconocido tóxico para los mamíferos. La intoxicación con  $Pb^{2+}$  genera una variada gama de síntomas de manifestación clínica en los seres humanos que afecta desde el sistema nervioso central, al funcionamiento hepático, renal y del sistema reproductivo, entre otras alteraciones (Flora y col., 2012).

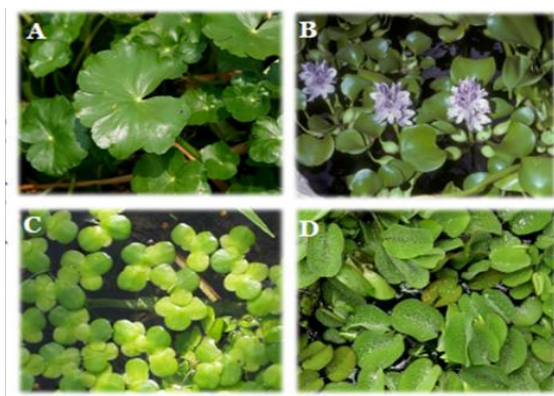
Las principales fuentes de liberación de  $Pb^{2+}$  al medio ambiente han sido las fundiciones, su antigua presencia como aditivo en pinturas, gasolina, baterías, plaguicidas y fertilizantes, y a causa de la actividad minera. Actualmente, el mayor riesgo asociado con la contaminación por  $Pb^{2+}$  se debe a su persistencia como residuo en el polvo urbano de las ciudades y a su incorporación en los cursos de ríos y aguas subterráneas producto de las lluvias y de la escorrentía agrícola (Marmioli y col., 2005).

Actualmente, la gestión integrada de los recursos hídricos, así como la restauración de áreas ambientalmente degradadas, han impulsado la demanda por el desarrollo de tecnologías más limpias y sustentables orientadas a la remoción de contaminantes y a la minimización del impacto ambiental causado por compuestos tóxicos presentes en los efluentes industriales. En este sentido, los sistemas naturales de tratamiento que involucran procesos de biorremediación como parte de su mecanismo de remediación han cobrado interés, resultando muy útil como método alternativo a las tecnologías tradicionales para el tratamiento de aguas contaminadas.

## METODOLOGÍA

### Recolección y cultivo de plantas acuáticas

Se recolectaron especímenes de *Hydrocotyle ranunculoides*, *Eichhornia crassipes*, *Lemma minor* y *S. biloba* en la zona del río Paraná Medio (litoral entrerriano-santafesino) (Fig. 1).



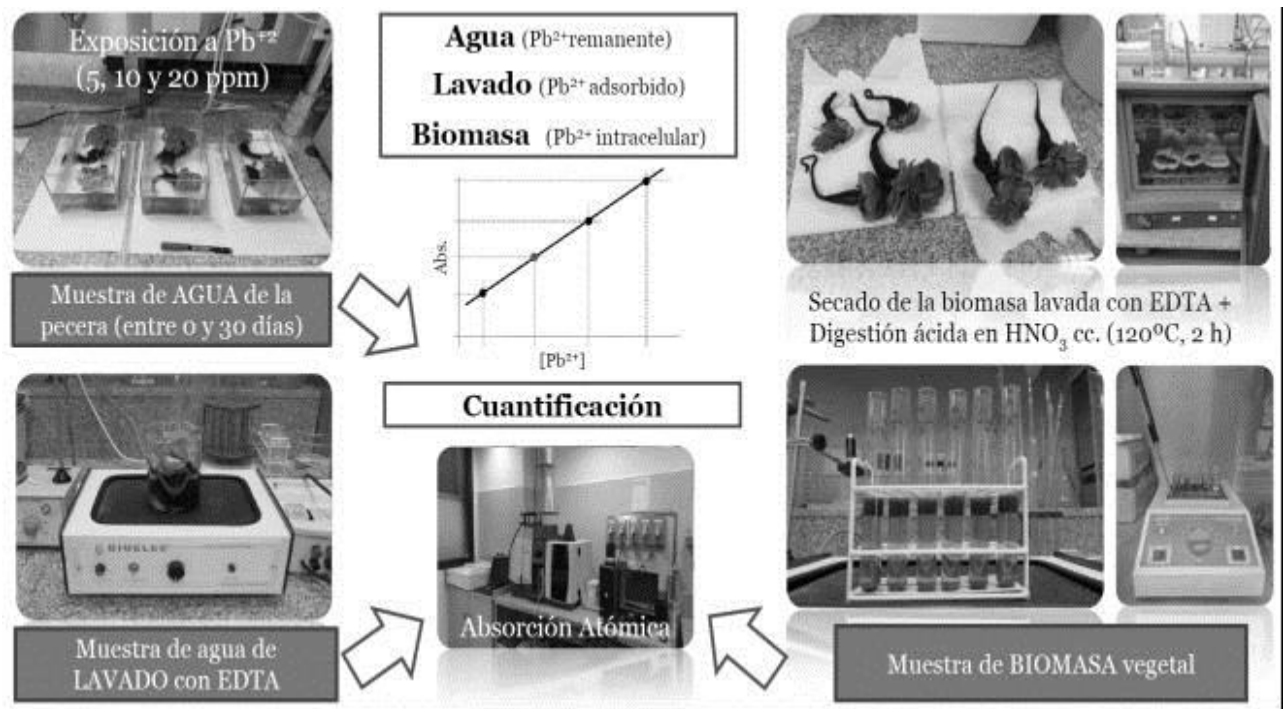
**Figura 1.** Especímenes de A) *Hydrocotyle ranunculoides*, B) *Eichhornia crassipes*, C) *Lemma minor* y D) *Salvinia biloba* recolectados en el litoral entrerriano-santafesino (río Paraná Medio).

Las especies seleccionadas se trasladaron al laboratorio a temperatura ambiente conservándose en el agua de los humedales del cual fueron extraídas. Luego, se sub-cultivaron en condiciones de invernadero a  $23\pm 2^\circ\text{C}$  con iluminación artificial operando en ciclos luz/oscuridad de 12 h. Las plantas que crecieron y se multiplicaron notablemente en estas condiciones, sin presentar signos visibles de tejido dañado o deteriorado, fueron empleadas en los estudios posteriores (Torres y col., 2007; Sánchez-Galván, 2008).

**Evaluación de la capacidad fitorremediadora y de los mecanismos involucrados**

La capacidad fitodepuradora de  $\text{Pb}^{2+}$  se evaluó sólo en aquellas especies vegetales que mejor se adaptaron al crecimiento en condiciones de laboratorio. Para ello, se instalaron diferentes unidades experimentales conforme a un sistema de trabajo en lotes (Olguín y col., 2005). Brevemente, se emplearon recipientes de vidrio de 1,5 L de capacidad a los cuales se les adicionó 20,0 g de biomasa vegetal húmeda. A partir de una solución patrón de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  1000 mg/L (ppm) se realizaron diluciones adecuadas para obtener una concentración final de  $\text{Pb}^{2+}$  en cada recipiente correspondiente a 5, 10 ó 20 ppm. Adicionalmente, se incluyeron dos tipos de controles. El primero consistió en evaluar la posible adsorción del metal a la superficie del recipiente. Para ello, se dispuso una unidad experimental sin biomasa conteniendo el metal a la concentración inicial del tratamiento. El segundo control se utilizó para descartar la presencia de  $\text{Pb}^{2+}$  en las plantas, para lo cual se reservó un recipiente conteniendo sólo biomasa sin la presencia del metal en el medio. En todos los ensayos, y para todos los grupos experimentales, la temperatura de trabajo se mantuvo relativamente constante ( $23\pm 2^\circ\text{C}$ ).

Los mecanismos involucrados en el proceso de fitorremediación se evaluaron aplicando el análisis de compartimentalización descrito por Olguín y col. (2005). El contenido de metal en los diferentes compartimentos (*i.e.*, columna de agua, adsorbido en raíces, acumulado intracelularmente) se determinó a tiempo 0, 1/2, 2, 4, 6, 12, 24 h; y 7, 14, 21 y 30 días por espectroscopia de absorción atómica empleando un equipo Varian AA240FS (Varian Inc., USA) de acuerdo al procedimiento descrito por Tello Zevallos y col. (2015) (Fig. 2).



**Figura 2.** Esquema del protocolo experimental utilizado para la evaluación de la capacidad fitorremediadora y los mecanismos asociados mediante el empleo de un análisis de compartimentalización.

Finalmente, se calculó el *factor de bioconcentración* (FBC) a las 24 h de ensayo de acuerdo a la ecuación propuesta por Zayed y col. (1998):

$$\text{FBC} = \frac{\text{Contenido de Pb}^{2+} \text{ en el tejido de la biomasa (mg/Kg biomasa seca)}}{\text{Concentración inicial del metal en la solución (mg/L)}}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

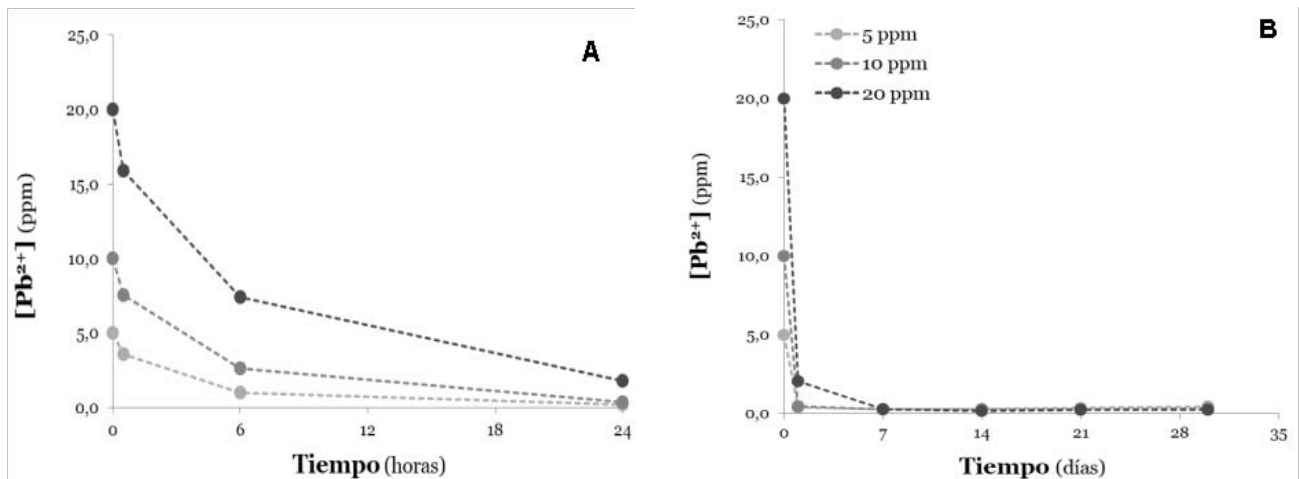
De las macrófitas seleccionadas, sólo *S. biloba* demostró una amplia capacidad de adaptación en condiciones de invernadero. Como puede observarse en la Figura 3, los especímenes pertenecientes a esta especie crecieron y se multiplicaron notablemente en estas condiciones, sin presentar signos o evidencias de tejido dañado o deteriorado.



**Figura 3.** *S. biloba* demostró una amplia capacidad de adaptación y reproducción en condiciones de laboratorio sin necesidad del agregado de nutrientes especiales al medio de cultivo, y sin evidenciar manifestaciones de tejido dañado o deteriorado.

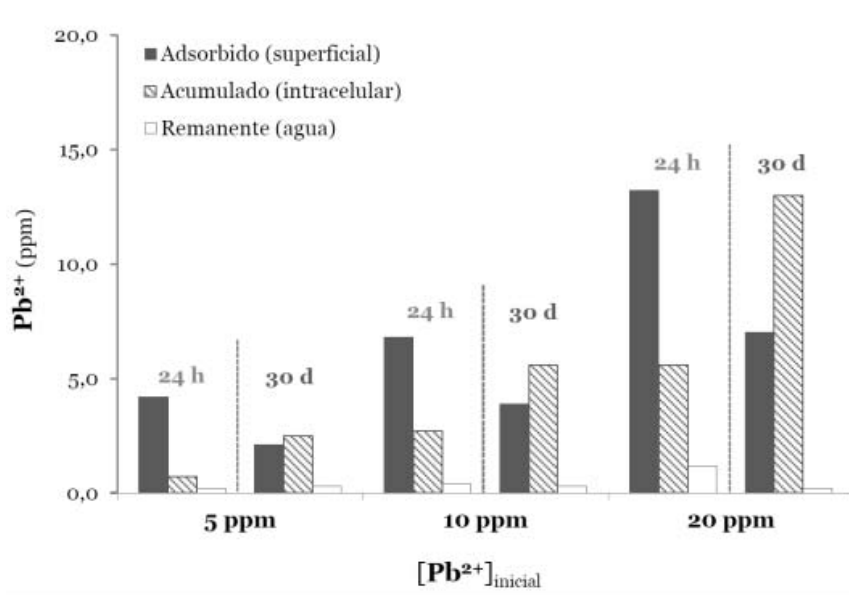
Esta gran capacidad de adaptación al cultivo en condiciones de laboratorio de diferentes especies del género *Salvinia* sp. ha sido anteriormente descrita por numerosos autores quienes además han resaltado la pertinencia del empleo de estas macrófitas acuáticas para procesos de fitorremediación (Sem y Bhattacharyya, 1994; Zayed y col., 1998; Olgún y col., 2005; Suñe y col., 2007; Sánchez-Galván y col., 2008; Dhir, 2009).

En consecuencia, al evaluar su potencial como fitodepuradora de  $Pb^{2+}$  se observó una eficiencia de remoción del contaminante superior al 90% para todas las concentraciones ensayadas en las primeras 24 h (Fig. 4A), manteniéndose a lo largo de los 30 días de estudio (Fig. 4B). Además, durante el prolongado período de exposición al contaminante, las plantas no manifestaron signos visibles de toxicidad.



**Figura 4.** Eliminación de  $Pb^{2+}$  en muestras de agua contaminadas artificialmente con diferentes concentraciones del metal, empleando un sistema en lotes operados con *S. biloba* durante, A) 24 h y, B) 30 días.

Mediante el análisis de compartimentalización se procedió a determinar la distribución del metal en el microcosmos de la planta. Para ello, se definieron 3 destinos o “compartimentos” probables para encontrar al metal durante el proceso de fitorremediación: 1) en la columna de agua, 2) adsorbido a la superficie de la biomasa vegetal, 3) acumulado intracelularmente. Los resultados obtenidos permitieron concluir que la *adsorción superficial* es el principal mecanismo extractivo durante las primeras 24 h, cobrando mayor relevancia la *acumulación intracelular* a partir de los 14 días (Fig. 5).



**Figura 5.** Distribución del contenido de  $Pb^{2+}$  en los tres compartimentos definidos a las 24 h y a 30 días para distintas concentraciones iniciales del metal.

El modo de captación del metal en los procesos de fitorremediación con plantas acuáticas varía dependiendo de la especie vegetal y del metal. La biorremediación de metales pesados en *Salvinia* sp., y su distribución, depende y varía conforme a la presencia de nutrientes y agentes quelantes en el medio, que se corresponde con diferentes situaciones o condiciones ambientales (Olguín *et al.*, 2005). La captación de metales en *Salvinia* sp. se produce a través de mecanismos físicos y biológicos. El primer mecanismo es la adsorción superficial, el cual es un proceso físico, rápido, reversible, e implica fenómenos de adherencia, intercambio iónico y complejación. El segundo mecanismo es un proceso biológico de captación intracelular del metal por medio de un transporte activo a través de la membrana plasmática de las células y es comparativamente más lento (Suñe *et al.*, 2007).

Finalmente, a partir del cálculo de la relación entre la cantidad de metal encontrado en la biomasa (mg/Kg) a las 24 h y la concentración inicial del metal en el medio circundante (mg/L) se halló un FBC promedio de 1230, para las tres concentraciones de  $Pb^{2+}$  estudiadas. La elección de este tiempo para el cálculo del FBC fue a criterio del elevado porcentaje (>90%) de remoción del contaminante hallado a las 24 h, a partir del cual este valor se mantuvo prácticamente inalterable hasta el final del período de estudio (30 días). En el caso de las plantas acuáticas, Zayed y col. (1998) propusieron como criterio para definir a las especies como *hiperacumuladoras* de metales un valor de  $FBC > 1000$ , el cual indica que el organismo es capaz de concentrar el producto hasta un valor mil veces superior al encontrado en el medio ambiente. De acuerdo a esta definición, los valores calculados para *S. biloba* indican que esta especie es capaz de hiperacumular  $Pb^{2+}$ .

Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio fueron reportados previamente para *S. minima* (Olguín *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2008; Dhir, 2009) demostrando la capacidad de este género como planta hiperacumuladora de metales. La elevada tasa de remoción posiblemente se encuentre relacionada con su gran superficie específica y con las características fisicoquímicas de su raíz (Sánchez-Galván y col., 2008). Nuestros resultados sustentan estas observaciones, ampliando el espectro de especies nativas de *Salvinia* con potencial para ser empleadas en el desarrollo de fitotecnologías orientadas a la remoción de metales pesados, y en especial, de  $Pb^{2+}$ .

## CONCLUSIONES

En el presente estudio, se evaluó la capacidad de crecimiento y adaptación a condiciones de cultivo en laboratorio de diferentes macrófitas autóctonas, de flotación libre, recolectadas de la zona del río Paraná Medio con el objetivo de utilizarlas para la remediación de aguas contaminadas con metales pesados. De las diferentes especies analizadas, sólo *S. biloba* demostró una amplia capacidad de reproducción en condiciones de invernadero sin la necesidad del agregado de nutrientes al medio de cultivo. Al evaluar su eficiencia para eliminar  $Pb^{2+}$  en muestras de agua contaminadas artificialmente con 5, 10 ó 20 ppm del metal, estableciendo un sistema en lotes operados con *S. biloba* durante 30 días, se observó un porcentaje de remoción del contaminante superior al 90% para las tres concentraciones ensayadas en las primeras 24 h. Los estudios de compartimentalización demostraron que los principales mecanismos involucrados en este proceso son la adsorción superficial y la acumulación intracelular del contaminante. Estos mecanismos se maximizan diferenciadamente a lo largo del tiempo, siendo más relevante la adsorción superficial en las primeras horas

del proceso y la acumulación intracelular a partir de los 14 días de exposición al metal. Estos resultados contribuyen a entender los fenómenos implicados en procesos de biorremediación utilizando plantas acuáticas, y podrían ser aplicables al desarrollo y optimización de fitotecnologías orientadas al tratamiento de efluentes contaminados con metales pesados.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen muy especialmente a la Facultad de Química e Ingeniería del Rosario de la Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA-campus Rosario) por los fondos suministrados para la ejecución de este proyecto. El Mg. Ing. W. Tello Zevallos agradece al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (PRONABEC) del Ministerio de Educación de la República del Perú por el apoyo económico recibido para la realización de sus estudios de posgrado. La Ing. Dana Loureiro, desea expresar su gratitud al Comité Académico del IV Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAPROBIO 2016) por el premio recibido al “mejor póster” presentado durante el congreso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA. American Public Health Association (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed.
- Dhir, B. (2009). *Salvinia*: an aquatic fern with potential use in phytoremediation. *Environ. We Int. J. Sci. Tech.*, 4: 23-27.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E., Marmioli, N. (2005). Evidence of the involvement of plant lignocellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis. *Environ. Poll.*, 134: 217-227.
- Olguín, E.J., Sánchez, G., Pérez, T., Pérez, A. (2005). Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of Pb (II) in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 32(11): 577-586.
- Rai, P.K. (2008). Heavy metal pollution in aquatic ecosystems and its phytoremediation using wetland plants: an ecosustainable approach. *Int. J. Phytoremediat.*, 10: 133-160.
- Prasad, M.N.V. (2003). Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: hype for commercialization. *Russ. J. Plant Physiol.*, 50(5): 686-700.
- Sánchez-Galván, G., Monroy, O., Gómez, J., Olguín, E.J. (2008). Assessment of the hyperaccumulating lead capacity of *Salvinia minima* using bioadsorption and intracellular accumulation factors. *Water Air Soil Poll.*, 194(1-4): 77-90.
- Sen, A.K., Bhattacharyya, M. (1994). Studies of uptake and toxic effects of Ni(II) on *Salvinia natans*. *Water Air Soil Poll.*, 78: 141-152.
- Suñe, N., Sánchez, G., Caffaratti, S., Maine, M.A. (2007). Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environ. Poll.*, 145: 467-473.
- Tello Zevallos, W., Salvatierra, L. M., Pérez, L. M. (2015). Evaluación de los mecanismos de eliminación de Pb<sup>2+</sup> en sistemas de fitorremediación en lotes operados con *Salvinia biloba* Raddi (acordeón de agua). *Energeia*, 13(13): 10-17.
- Zayed, A., Gowthaman, S., & Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *J. Environ. Qual.*, 27(3): 715-721.
- Ali, H., Khan, E., y Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals - concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7): 869-881.
- Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdiscip. Toxicol.*, 5(2): 47-58.
- Sharma, P., Pandey, S. (2014). Status of phytoremediation in world scenario. *Int. J. Environ. Biorem. Biodeg.*, 2(4), 178-191.