

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA



TESIS

Para optar el título profesional de :
LICENCIADO EN QUÍMICA

Estudio de los parámetros fisicoquímicos para la fitorremediación de cadmio (II) y mercurio (II) con la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Presentado por :

VICTOR RAUL POMA LLANTOY

Asesora: Dra. ANA CECILIA VALDERRAMA NEGRÓN

Lima - Perú

2014

Digitalizado por:

Consortio Digital del
Conocimiento MebLatam,
Hemisferio y Dalse

Dedicatoria

Le dedico mi trabajo primeramente a Dios, que me ha dado fortaleza para continuar cuando estuve en momentos difíciles.

De igual forma, a mis padres y hermanos a quienes les debo toda mi vida, les agradezco el cariño y su comprensión, a mis maestros, por su tiempo, por su apoyo y por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

Y en especial con todo el amor y cariño le dedico a mi hijo Enzo André que me fortalece todos los días de mi vida para seguir adelante.

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a la Dra. Ana C. Valderrama por su valiosa asesoría en el desarrollo de esta tesis de investigación, por su apoyo desinteresado durante el periodo que demandó este trabajo y por el apoyo en general que ofrece a los estudiantes.

De igual forma agradezco al técnico químico Julio Trauco, por su colaboración en la lectura de las concentraciones de los iones cadmio (II) y mercurio (II) en las muestras de *Eichhornia crassipes*, mediante la técnica de absorción atómica e ICP-OES, compañero con quien logramos la determinación de los iones metálicos en estudio, durante el tiempo que labore en la empresa ALS Perú S.A.

Resumen

Estudio de los parámetros fisicoquímicos para la fitorremediación de cadmio (II) y mercurio (II) con la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

En este trabajo se han hecho estudios para medir la capacidad de absorción de la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), mostrándose sensible a la prueba de variación de pH y la variación de la concentración de los iones metálicos cadmio (II) y mercurio (II), obteniendo resultados que nos permitieron cuantificar la absorción de los mismos.

Este estudio incluye ensayos donde se optimizan condiciones de concentración de nutrientes, pH y concentración de iones metálicos, los que se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con soluciones acuosas de ambos metales a las que fueron sometidas las muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), para corroborar la remoción de los metales cadmio (II) y mercurio (II). Las soluciones residuales después de haber sido sometidas con la especie vegetal, fueron tratadas usando el método APHA 3030-e, y las muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) fueron tratadas usando el método EPA 200.3 (Digestión de tejidos animal y vegetal) donde la concentración de los iones metálicos fue medida por un equipo ICP-OES para el cadmio (II) y un equipo de absorción atómica acoplado a un generador de hidruros para el mercurio (II).

Los resultados obtenidos fueron; dosis óptima 1mL de A y 0,5 mL de B, pH óptimo 5, concentración óptima de cadmio (II) y mercurio (II) 5 mg/L para ambos iones metálicos. Luego de obtener estos parámetros que optimizan la supervivencia de la especie vegetal, se aplicaron para la remoción de cadmio (II) y mercurio (II) en soluciones conteniendo 5 mg/L de estos iones metálicos. Los resultados más relevantes, los porcentajes de absorción en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), de 16,56 % para cadmio (II) y 15,6 % para el mercurio (II) en un periodo de 7 días. Siendo esto posible gracias a los diferentes mecanismos de absorción que la especie desarrolla, empleando diferentes proteínas como fitoquelatinas, metalotioneínas y otros compuestos tiólicos que la especie vegetal contiene.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. Introducción.....	(20)
1.1. Justificación.....	(22)
1.2. Objetivos.....	(23)
1.2.1. Objetivos generales.....	(23)
1.2.2. Objetivos específicos.....	(23)

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

2. Antecedentes.....	(25)
----------------------	------

CAPÍTULO III: FITORREMEDIACIÓN

3. Marco teórico.....	(27)
3.1. Fitorremediación.....	(27)
3.2. Aspectos generales de la fitorremediación.....	(28)
3.3. Mecanismos de fitorremediación.....	(30)
3.3.1. Fitoextracción o fitoacumulación.....	(30)
3.3.2. Rizofiltración.....	(30)
3.3.3. Fitoestabilización.....	(31)
3.3.4. Fitoestimulación.....	(31)
3.3.5. Fitovolatilización.....	(31)
3.3.6. Fitodegradación o fitotransformación.....	(32)
3.4. Ventajas y desventajas de la fitorremediación.....	(33)
3.5. Tipos de contaminantes que se pueden eliminar.....	(34)
3.6. Aplicaciones de la fitorremediación en aguas.....	(34)
3.6.1. Rizofiltración.....	(34)
3.6.1.1. Barreras hidráulicas.....	(34)
3.6.1.1. Biosorción.....	(35)
3.6.2. Coberturas vegetales.....	(35)
3.6.3. Sistemas de humedales para tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales.....	(35)
3.6.4. Contención de riberas.....	(36)
3.6.5. Sistemas hidropónicos para el tratamiento de aguas.....	(36)
3.7. Toxicidad de cadmio y mercurio en las plantas.....	(37)

3.7.1. Toxicidad del cadmio en las plantas.....(37)
3.7.2. Fuentes de contaminación de cadmio.....(39)
3.7.3. Toxicidad del mercurio en plantas.....(40)
3.7.4. Fuentes de contaminación del mercurio.....(42)
3.7.5. Efectos tóxicos comunes por elementos pesados..... (45)

CAPÍTULO IV: *Eichhornia crassipes*.

4. Tipo de plantas acuáticas.....(48)
4.1. Emergentes.....(48)
4.2. Flotantes.....(48)
4.2.1. Plantas de libre flotación (no fijas).....(48)
4.2.2. Plantas de hoja flotante (fijas).....(49)
4.2.3. Sumergidas.....(50)
4.3. *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(51)
4.3.1. Taxonomía y características morfológicas de *Eichhornia crassipes*
(Jacinto de agua).....(51)
4.4. Mecanismos de tolerancia a metales pesados.....(53)
4.5. Componentes de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(54)
4.5.1. Cisteína.....(54)
4.5.2. Glutación.....(54)
4.5.3. Las metalotioneínas.....(55)
4.5.4. Las fitoquelatinas.....(57)
4.5.5. Ácidos orgánicos y aminoácidos.....(59)
4.6. Toxicidad de metales pesados en plantas: Una visión general sobre el papel del
glutación y fitoquelatinas en metales pesados y la tolerancia al estrés de las plantas.....(59)
4.7. Mecanismo de respuesta de las plantas a la presencia de metales pesados.....(60)
4.8. Hiperacumulación de metales pesados en plantas.....(62)
4.9. Compartimentación.....(64)
4.10. Aplicaciones de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de Agua).....(65)
4.11. Composición química de nutrientes para la especie *Eichhornia crassipes*
(Jacinto de agua).....(66)

CAPÍTULO V: PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL.....(68)

5.1. Materiales, equipos y reactivos.....(68)

5.2. Muestreo de la especie vegetal *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(70)

5.3. Parámetros fisicoquímicos del agua de muestreo.....(71)

5.4. Métodos estandarizados utilizados.....(74)

5.4.1. Método digestión de metales (APHA 3030-d, 21st ed. 2005).....(74)

5.4.2. Método para digestión por ácido nítrico (APHA 3030-e, 21st ed. 2005).....(74)

5.4.3. Método EPA 200.3: Digestión de metales en tejido por ICPOES/ICPOMS y absorción atómica.....(75)

5.4.4. Método espectrométrico de absorción atómica de vapor frío (APHA 3112-b, 21st ed. 2005).....(76)

5.5. Preparación de los nutrientes para la optimización.....(77)

5.5.1. Preparación de la solución concentrada "A".....(78)

5.5.2. Preparación de la solución concentrada "B".....(78)

5.5.3. Preparación de la solución concentrada de micronutrientes.....(78)

5.6. Determinación de la dosis óptima de nutrientes para *Eichhornia crassipes*.....(79)

5.7. Efecto del pH sobre la viabilidad de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) y la solubilidad del metal.....(81)

5.8. Determinación de la Concentración Óptima de los metales para la viabilidad de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(83)

5.9. Determinación de la concentración de cadmio (II) y mercurio (II) presentes en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(85)

5.9.1 Determinación de cadmio (II) y mercurio (II) en la misma planta.....(85)

5.9.2. Determinación de cadmio (II) en la misma planta.....(86)

5.9.3. Determinación de mercurio (II) en la misma planta.....(87)

5.10. Determinación de cadmio (II) y mercurio (II) en las soluciones residuales tratadas con *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(88)

5.10.1. Determinación de cadmio (II) en la solución residual de *Eichhornia crassipes*.....(89)

5.10.2. Determinación de mercurio (II) en la solución residual de *Eichhornia crassipes*.....(90)

5.11. Determinación de cadmio (II) y mercurio (II) en la raíz, tallo y hojas para una muestra de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(90)

CAPÍTULO VI: RESULTADOS Y DISCUSIONES

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....(93)

- 6.1. Determinación de la dosis óptima de nutrientes para la viabilidad de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(93)
- 6.2. Efecto del pH sobre la viabilidad de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) y la solubilidad del metal.....(95)
- 6.3. Determinación de la concentración óptima de los metales para la viabilidad de las plantas.....(97)
- 6.4. Determinación de la concentración de cadmio (II) y mercurio (II) presentes en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(100)
- 6.5. Determinación de cadmio (II) en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(106)
- 6.6. Determinación de mercurio (II) en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(109)
- 6.7. Determinación de cadmio (II) y mercurio (II) en las soluciones residuales tratadas con *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(113)
 - 6.7.1. Determinación de cadmio (II) en solución residual de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(116)
 - 6.7.2. Determinación de mercurio (II) en solución residual de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(119)
- 6.8. Determinación de cadmio (II) y mercurio (II) en las raíz, tallo y hojas para una muestra de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(122)

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES.....(124)

CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES

8. RECOMENDACIONES.....(127)

CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....(129)

CAPÍTULO IX: ANEXOS

10. ANEXOS.....(139)

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1: Ventajas y desventajas de la fitorremediación.....(33)

Cuadro 3.2: Constantes de estabilidad aparente para Hg, Cd, Pb y diferentes grupos bioquímicos.....(46)

Cuadro 4.1: Plantas capaces de acumular cuatro a mas metales.....(66)

Cuadro 4.2: Composición química de nutrientes.....(66)

Cuadro 5.1: Detalle de materiales de campo, muestreo y siembra.....(68)

Cuadro 5.2: Detalle de equipos de campo, oficina y laboratorio.....(68)

Cuadro 5.3: Ensayos fisicoquímicos realizados a la muestra de agua donde crecía
Eichhornia crassipes (Jacinto de agua).....(69)

Cuadro 5.4: Resultados de metales encontrados en aguas del punto de muestreo del
Jacinto de agua, determinados por ICP-MS y absorcion atomica.....(72)

Cuadro 5.5: Reactivos usados en el laboratorio durante la investigación.....(73)

Cuadro 5.6: Composición de de las soluciones concentradas de nutrientes.....(77)

Cuadro 5.7: Dosis de la solución A y B para diferentes muestras (plantas)..... (79)

Cuadro 5.8: Muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) para la optimización del pH y la
solubilidad de cadmio (II) y mercurio (II).....(81)

Cuadro 5.9: Número de muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) sometidas a una
determinada concentración de cadmio (II) y mercurio (II).....(83)

Cuadro 5.10 : Identificación y pesos de las muestras (plantas) recolectadas.....(85)

Cuadro 5.11: Identificación y pesos de las muestras recolectadas con cadmio (II) para cada tiempo.....(86)

Cuadro 5.12: Identificación y pesos de las muestras recolectadas con mercurio (II) para cada tiempo...(87)

Cuadro 5.13 : Identificación de las soluciones residuales de cadmio (II) y mercurio (II) recolectadas
para cada tiempo.....(88)

Cuadro 5.14: Identificación de las soluciones residuales de cadmio (II) recolectadas para cada
tiempo.....(89)

Cuadro 5.15: Identificación de las soluciones residuales de mercurio (II) recolectadas para cada
tiempo.....(90)

Cuadro 5.16: Identificación y pesos de las muestras de cadmio (II) (7 días) y mercurio (II) (4 días).....(91)

Cuadro 6.1: Resultados de tiempo de supervivencia de cada muestra(93)

Cuadro 6.2: Resultados luego de la optimización del pH y la solubilidad del metal.....(96)

Cuadro 6.3: Resultados de la optimización de los metales en función al tiempo de supervivencia a
diferentes concentraciones del metal.....(99)

Cuadro 6.4 : Lectura en mg/L de cadmio (II) y mercurio (II) medidas en las alícuotas tomadas.....(105)

Cuadro 6.5: Concentraciones de cadmio y mercurio en mg/kg presentes en *Eichhornia crassipes*
(Jacinto de agua).....(102)

Cuadro 6.6: Resultados del porcentaje de absorción (%A) de cadmio (II) y mercurio (II) en
Eichhornia crassipes (Jacinto de agua) para cada muestra analizada.....(103)

Cuadro 6.7 : Lecturas en mg/L medidas en las alícuotas tomadas y las concentraciones en mg/kg de cadmio (II).....(106)

Cuadro:6.8 : Resultados del porcentaje de absorción (%A) de cadmio (II) en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) para cada muestra analizada.....(107)

Cuadro 6.9 : Lecturas en mg/L de mercurio (II), medidas en las alícuotas tomadas y las respectivas concentraciones en mg/kg de mercurio (II).....(109)

Cuadro 6.10: Resultados del porcentaje de absorción (%A) de mercurio (II) en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) para cada muestra analizada.....(110)

Cuadro 6.11: Concentraciones de cadmio (II) y mercurio (II) obtenidas de las soluciones residuales....(113)

Cuadro 6.12: Resultados del porcentaje de remoción (%R) de cadmio (II) y mercurio (II) en cada solución residual analizada.....(114)

Cuadro 6.13 : Concentración de cadmio (II) que se obtiene en las soluciones residuales.....(116)

Cuadro 6.14: Resultados del porcentaje de remoción (%R) de cadmio (II) en cada solución residual analizada.....(117)

Cuadro 6.15: Concentración de mercurio (II) que se obtiene en las soluciones residuales.....(119)

Cuadro 6.16: Resultados del porcentaje de remoción (%R) de mercurio (II) en cada solución residual analizada.....(120)

Cuadro 6.17: Lecturas de la concentraciones en mg/L y mg/kg de las alícuotas tomadas de cadmio (II) y mercurio (II) para cada muestra analizada.....(122)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(21)

Figura 3.1: Diagrama que representa los tipos de fitorremediación de una planta.....(32)

Figura 3.2: Interacción de la lluvia acida en las plantas.....(35)

Figura 3.3: Plantas que absorben aguas subterráneas.....(35)

Figura 3.4: Plantas que absorben aguas subterráneas.....(36)

Figura 3.5: Cultivos hidropónicos.....(36)

Figura 3.6: Esquema de la respuesta celular al cadmio: producción de ROS, daños oxidativos y señalización.....(38)

Figura 3.7: Fuentes de contaminación de cadmio y otros metales pesados.....(39)

Figura 3.8: Ciclo biogeoquímico del mercurio.....(41)

Figura 3.9: Ciclo de contaminación del mercurio.....(44)

Figura 3.10: Estructura química de la cisteína.....(46)

Figura 4.1: *Sagittaria latifolia* (Platanillo).....(48)

Figura 4.2: *Lemna spp* (Lenteja de agua).....(49)

Figura 4.3: *Nymphaea elegans* (Nenúfares).....(49)

Figura 4.4: *Cerathophyllum demersum* (Bejuquillo).....(50)

Figura 4.5: Humedales donde crece *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) en el distrito de Carabayllo.....(52)

Figura 4.6 : Mecanismo de destoxificación de cromo, llevado a cabo por *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(53)

Figura 4.7: Estructura química del glutatión (GSH).....(55)

Figura 4.8: Secuencia de metalotioneína (MT) humana, con 11 cisteínas en el dominio alfa y 9 cisteínas en el dominio beta.....(56)

Figura 4.9: Representación de la fitoquelatina PC₂ en que se destacan los fragmentos más relevantes : GSH (Glutatión), Glu (Ácido glutámico), Cys (Cisteína) y Gly (Glicina).....(57)

Figura 4.10: Representación esquemática del complejo fitoquelatina-cadmio.....(58)

Figura 4.11: Resumen de los mecanismos potenciales celulares disponibles para la destoxificación y tolerancia de metales en plantas.....(61)

Figura 4.12: Mecanismos implicados en la hipertolerancia de metales pesados y la distribución de metales pesados en una planta no hiperacumuladora (izquierda) y una hiperacumuladora (derecha).....(63)

Figura 4.13: Especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(65)

Figura 5.1: Izquierda (Muestreo de Jacinto de agua), derecha (Colocación del Jacinto de agua en la piscina de cultivo).....(70)

Figura 5.2: Muestreo del agua donde crece *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(70)

Figura 5.3: Diagrama de flujo para digestión de metales y lectura por ICP-OES, ICP-MS y absorción atómica. (APHA 3030-e, 21st ed. 2005).....(74)

Figura 5.4: Diagrama de flujo para la digestión de tejidos por ICP-OES-MS (Método Epa 200.3).....(75)

Figura 5.5 :Diagrama de flujo para determinación de mercurio por generación de hidruros (APHA 3112-b, 21st ed. 2005).....(76)

Figura 5.6: Izquierda; Se muestra *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) con una dosis de 1 mL de A y 1 mL de B (muestra 3) y Derecha; se muestra *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) con una dosis de 5 mL de A y 5 mL de B (muestra 11) en el primer día.....(80)

Figura 5.7: Izquierda; se muestra *Eichhornia Crassipes* (Jacinto de agua) con la dosis de 1 mL de A y 1 mL de B (muestra 3) y Derecha; se muestra *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) con una dosis de 5 mL de A y 5 mL de B (muestra 11) después de 15 días.....(80)

Figura 5.8: Izquierda; *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) sometida a una solución de 1 ppm de mercurio (II) a pH=1,5 después de 9 días, derecha; *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) sometida a una solución de 1 ppm de cadmio (II) a un pH=2 después de 9 días.....(82)

Figura 5.9: Se muestra *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) a pH=8 a una concentración de 1 ppm de mercurio (II) después de 9 días.....(82)

Figura 5.10: Izquierda (solución de 20 ppm de cadmio (II) frente al Jacinto de agua después de 8 días). Derecha (Vista lateral que muestra la etiqueta rotulada con los datos de la muestra).....(84)

Figura 5.11: Izquierda (solución de 25 ppm de mercurio (II) frente al Jacinto de agua después de 8 días. Derecha (Vista lateral que muestra la etiqueta rotulada con los datos de la muestra).....(84)

Figura 6.1: Foto del Jacinto de agua a una concentración de A=1 mL y B=0,5 mL, luego de 22 días.....(94)

Figura 6.2: Curva del tiempo de supervivencia en días para 1ppm de cadmio (II) en función de pH y mercurio (II) a una dosis de nutrientes A=1 ml y B=0,5 mL y temperatura $25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$(96)

Figura 6.3: *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) después ser sometidas durante 10 días en una solución de 5 mg/L de cadmio (II) a pH=5.....(98)

Figura 6.4: *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) después de ser sometidas durante 10 días en una solución de 5 mg/L de mercurio (II) a pH 5.....(98)

Figura 6.5: Curva del tiempo de supervivencia del Jacinto de agua vs la concentración del metal.....(99)

Figura 6.6: Curva de concentración en mg/kg de cadmio (II) y mercurio (II) en función del tiempo en horas presentes en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).....(104)

Figura 6.7: Curva de porcentaje de absorción (%A) de cadmio (II) y mercurio (II) en función del tiempo en horas.....(104)

Figura 6.8: Curva de concentración (mg/kg) de cadmio (II) en función del tiempo en horas para cada

muestra analizada.....(108)

Figura 6.9: Curva de porcentaje de absorción (%A) del cadmio (II) en función del tiempo en horas.....(108)

Figura 6.10: Curva de concentración (mg/kg) de mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada muestra analizada.....(111)

Figura 6.11: Curva de porcentaje de absorción (%A) de mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada muestra analizada.....(111)

Figura 6.12: Curva de concentración (mg/L) de cadmio (II) y mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.....(115)

Figura 6.13: Curva de porcentaje de remoción (%R) de cadmio (II) y mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.....(115)

Figura 6.14: Curva de concentración (mg/L) de cadmio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.....(118)

Figura 6.15: Curva de porcentaje de remoción (%R) de cadmio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.....(118)

Figura 6.16: Curva de concentración (mg/L) de mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.....(121)

Figura 6.17: Curva de porcentaje de remoción (%R) de mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.....(121)

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: MÉTODOS ESTANDARIZADOS PARA TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE MUESTRAS

1. Método digestión de metales (APHA 3030-D, 21ST ED. 2005).....	(139)
1.1. Selección del ácido.....	(139)
1.2. Procedimiento de digestión.....	(140)
2. Método para digestión por ácido nítrico (APHA 3030-E, 21ST ED. 2005).....	(142)
2.1. Digestión para absorción atómica de llama y niveles de concentraciones altas.....	(142)
2.1.1. Instrumental.....	(142)
2.1.2 Reactivos.....	(142)
2.1.3 Procedimiento.....	(142)
3. Método EPA 200.3 (Digestión de metales en tejido por ICPOES/ICPOMS y absorción atómica).....	(143)
3.1. Alcance y aplicación.....	(143)
3.2. Resumen del método.....	(143)
3.3. Definiciones.....	(143)
3.4. Interferencias y efecto matriz.....	(143)
3.5. Seguridad.....	(144)
3.6. Aparatos y equipos.....	(145)
3.6.1 Material de laboratorio.....	(145)
3.6.2. Equipo de procesamiento de muestras.....	(145)
3.6.3. Equipo de disección de tejidos.....	(145)
3.6.4. Reactivos y materiales consumibles.....	(146)
3.6.5. Colección de muestras, preservación y almacenamiento.....	(146)
3.7. Control de calidad.....	(147)
3.7.1. Blanco del método.....	(147)
3.7.2. Blanco de tejido.....	(147)
3.7.3. Duplicados de muestra.....	(148)
3.7.4. Material de referencia certificado.....	(148)
3.7.5. Blanco de tejido adicionado.....	(148)
3.8 Procedimiento.....	(149)
3.8.1 Preparación de la muestra.....	(149)
3.8.2 Digestión de la muestra.....	(149)
3.8.3 Lectura de muestras.....	(150)
3.9. Cálculos y resultados finales.....	(150)

4. Método espectrométrico de absorción atómica de vapor frío (APHA 3112-B, 21ST ED. 2005).....	(152)
4.1. Discusión general.....	(152)
4.2. Instrumental.....	(152)
4.2.1 Espectrómetro de absorción atómica y equipo asociado.....	(152)
4.2.2. Soporte de la celda.	(152)
4.2.3 Bombas de aire.....	(152)
4.2.4 Flujómetro.	(152)
4.2.5. Tubos de aireación.....	(152)
4.2.6. Matraz de reacción.....	(152)
4.2.7. Tubo desecador.....	(153)
4.2.8. Tubos de conexión.....	(153)
4.3. Reactivos.....	(153)
4.4. Procedimiento.....	(154)
4.4.1. Operación del instrumento.....	(154)
4.4.2. Estandarización.....	(154)
4.4.3 Análisis de muestras.....	(155)
4.5 Cálculos.....	(155)
4.6 Precisión y sesgo.....	(155)

ANEXOS 2: ESTANDARES DE CALIDAD

Tabla 1 : Estándares nacionales de calidad ambiental para agua categoría 1 (Poblacional y recreacional).....	(156)
Tabla 2 : Estándares nacionales de calidad ambiental para agua categoría 2 (Actividades marino costeras).....	(157)
Tabla 3 : Estándares nacionales de calidad ambiental para agua categoría 3 (Riego de vegetales).....	(158)
Tabla 4 : Estándares nacionales de calidad ambiental para agua categoría 3 (Bebidas de animales).....	(159)
Tabla 5 : Estándares nacionales de calidad ambiental para agua categoría 4 (Conservación del ambiente acuático).....	(160)
Tabla 6 : Límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades.....	(161)

ANEXO 3: FOTOS(162)

Foto 1: izquierda (muestras de *Eichhornia crassipes* (jacinto de agua) luego de ser sometidas a una solución de 5 ppm de cadmio (II) y mercurio (II)) derecha (muestra de jacinto de agua recolectada luego después de 7 días).....(162)

Foto 2: izquierda (muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) trituradas y homogenizadas para ser digeridas) derecha (muestra del digerido de jacinto de agua recolectado después de 6 días).....(162)

Foto 3: izquierda (muestras de solución residual) tomadas y etiquetadas en digitubos con su respectiva identificación para luego ser digeridas) derecha (muestra de solución residual recolectada luego después de 1 día).....(163)

Foto 4: Muestras con su respectiva identificación en la prueba de remoción de Cd (II) y Hg (II).....(163)

ANEXO 4: FIGURAS(164)

Figura 1: Esquema de las estrategias de remediación biológica de Hg y las más recientes y/o destacadas investigaciones que contribuyen al desarrollo y conocimiento del metabolismo y emoción del metal.....(164)

ANEXO 5 : CUADROS

Cuadro A.1 : Métodos estandarizados para tratamiento y análisis de muestras.....(139)

Cuadro A.2 : Concentraciones del metal en función de los volúmenes digeridos.....(141)

Cuadro A.3 : Precisión y sesgo inter laboratorios del método de espectrometría de absorción atómica de vapor frío para el mercurio.....(155)

LISTA DE ABREVIATURAS

- FQs : Fitoquelatinas.
- MTs : Metalotioneinas.
- Cys : Cisteina.
- Gly : Glicina.
- Glu : Glutamil.
- Met : Metionina.
- GR : Glutation reductasa.
- APX : Ascorbato peroxidasa.
- CAT : Catalasa.
- ROS : Especies de oxígeno reactivo.
- POD : Peroxidasa.
- ATP : Adenosín trifosfato.
- SOD : Superoxido dismutasa.
- NADPH : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
- GSH : Glutation.
- JA : Ácido jasmónico.
- SR : Solución residual.

GLOSARIO

- ✓ **Alelopatía** : La alelopatía es un fenómeno biológico por el cual un organismo produce uno o más compuestos bioquímicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos. Estos compuestos son conocidos como **aleloquímicos** y pueden conllevar a efectos benéficos (alelopatía positiva) o efectos perjudiciales (alelopatía negativa) a los organismos réceptores.
- ✓ **Bioacumulación** : El término bioacumulación hace referencia a la acumulación neta, con el paso del tiempo, de metales (u otras sustancias persistentes) en un organismo a partir de fuentes tanto bióticas (otros organismos) como abióticas (suelo, aire y agua).
- ✓ **Biofiltro** : También denominados filtros biológicos, son dispositivos que eliminan una amplia gama de compuestos contaminantes de una corriente de fluido (aire o agua) mediante un proceso biológico.
- ✓ **Biomasa** : Es el conjunto de recursos forestales, plantas terrestres y acuáticos, residuos y subproductos agrícolas, ganaderos urbanos e industriales.
- ✓ **Citosol** : El citosol o hialoplasma es la parte soluble del citoplasma de la célula. Está compuesto por todas las unidades que constituyen el citoplasma excepto, los orgánulos (proteínas, iones, glúcidos, ácidos nucleótidos metabolitos diversos, etc.). Representa aproximadamente la mitad del volumen celular.
- ✓ **Citotoxicidad** : La citotoxicidad celular constituye uno de los mecanismos efectores de determinadas poblaciones celulares especializadas del sistema inmunitario, consistente en la capacidad para interaccionar con otras células y destruirlas. Cualquier tipo celular normal o patológico, puede ser potencialmente susceptible a las células citotóxicas, y se emplea gráficamente el término "células diana" (target cells) para su designación
- ✓ **Desorción** : Es a fenómeno por el que una sustancia está lanzada o a través de una superficie. Es el proceso contrario de absorción (es decir, adsorción y absorción). Esto ocurre en un sistema que está en el estado del equilibrio de la absorción entre la fase móvil (líquido, solución del gas o del líquido) y una superficie adsorbente (sólido o límite que separa dos líquidos).
- ✓ **Destoxificación** : Proceso por el cual se eliminan sustancias tóxicas para el organismo. Los productos tóxicos liposolubles como drogas, insecticidas, herbicidas, medicamentos, productos industriales, etc., se destoxifican de los organismos vivos. La reacción de destoxificación más importante se realiza mediante el sistema enzimático del citocromo P450.
- ✓ **EPA**: Agencia de protección medioambiental de Estados Unidos.
Esta fuente energética puede ser aprovechada mediante su combustión directa a través de su transformación en biogás, bioalcohol, etcétera.

- ✓ **Fitorremediación** : Uso de plantas, y de su microbiota asociada para reparar suelos o aguas subterráneas contaminadas, Las técnicas de fitorremediación incluyen la utilización de enmiendas de suelo y técnicas agrónomas para trasladar, contener o convertir los contaminantes del medio en una forma química que disminuya su disponibilidad química o biológica.
- ✓ **Macrófitas** : Son plantas superiores, algas, musgos o briofitas macroscópicas, adaptadas a la vida en el medio acuático. Son importantes componentes ecológicos de los sistemas acuosos al ser productoras primarias que proveen hábitat para invertebrados
- ✓ **Metales pesados** : Elementos químicos del grupo de los metales con densidad superior a 4.5 g/cm^3 y masa atómica alta.
- ✓ **Omeostasis**: es una propiedad de los organismos vivos que consiste en su capacidad de mantener una condición interna estable (en la que su estado permanece casi invariante en el tiempo) compensando los cambios que se producen en su entorno mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior (metabolismo), La homeostasis es una forma de equilibrio dinámico posible gracias a una red de sistemas de control realimentados que constituyen los mecanismos de autorregulación de los seres vivos
- ✓ **Planta acuática** : También llamadas plantas hidrófilas, hidrófitas, hidrófiláceas o higrófitas. Son plantas adaptadas a los medios muy húmedos o acuáticos. Éstas plantas pueden encontrarse tanto entre las algas como entre los vegetales vasculares: briofitos, pteropsidas y angiospermas (familia de las monocotiledóneas y de las dicotiledóneas). Su adaptación al medio acuático es variable. Se pueden encontrar diferentes grupos de plantas: unas totalmente sumergidas, otras las más numerosas, parcialmente sumergidas o con hojas flotantes.
- ✓ **Solución estándar** : En química analítica, una solución estándar o disolución estándar es una disolución que contiene una concentración conocida de un elemento o sustancia específica, llamada patrón primario que, por su especial estabilidad, se emplea para valorar la concentración de otras soluciones, como las disoluciones valorantes.
- ✓ **Sorción** : Retención de una sustancia por otra cuando están en contacto; incluye las operaciones de absorción, adsorción, intercambio iónico y diálisis.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen diversas técnicas propuestas para la rehabilitación de contaminantes (suelo, sedimento, agua, atmósfera, etc.). Estas tecnologías de remediación son muy variables, dependiendo de la matriz contaminada, la naturaleza de los contaminantes, el nivel de contaminación y la disponibilidad de los recursos. El análisis actual del estado de las técnicas de remediación cuenta con un uso cada vez mayor en los países en desarrollo, lo que lleva a la reducción de costos, instalación, operación y monitoreo, debido a que el patrón de la evolución de las tecnologías de remediación, se centra en soluciones cada vez menos invasivas. Entre estas nuevas tecnologías que se están investigando, tenemos a la fitorremediación que hace uso de las plantas y sus microorganismos asociados, con el fin de tratar *in situ* suelos contaminados. Se trata de una tecnología emergente con un gran potencial para la limpieza eficiente y de bajo costo para una amplia gama de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Es digno de mención Brasil, que muestra la existencia de condiciones climáticas y ambientales francamente favorables al desarrollo de la tecnología en casi todo su territorio.

La macrófita *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) es una especie tropical que pertenece a la familia *Pontederiaceae*, es una planta flotante nacida en Brasil y posiblemente en el centro de Sudamérica y otros países de América. La encontramos en lagos que se mueven lentamente, ríos y pantanos, en la mayoría de países del mundo que se extiende entre 40 °N y 40 °S entre ellos la India, Sudáfrica y EE.UU. Es una planta acuática flotante conocida por su capacidad de producción y la eliminación de contaminantes del agua. Aquella planta puede crecer rápidamente a densidades muy altas (más de 60 kg.m⁻²), obstruyendo por completo los cuerpos de agua, que a su vez puede tener efectos negativos en el medio ambiente, la salud humana y el desarrollo económico.

El Jacinto de agua crece en una amplia variedad de tipos de humedales y prefiere aguas con nutrientes enriquecidos. Sin embargo, se puede tolerar una variación considerable en los niveles de nutrientes, temperatura y pH.

El pH óptimo para el crecimiento de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) es de 6-8. Puede crecer en una amplia gama de temperatura de 1 a 40 °C (óptimo crecimiento entre 25-27.5 °C) pero se cree que es sensible al frío^[1] "Las tasas de crecimiento se incrementan con el aumento de las cantidades de nitrógeno y agua".^[2] La salinidad es una limitación importante en el crecimiento de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua). En las regiones costeras la salinidad entre 6,0 y 8,0 ‰ es letal.^[3] La especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) normalmente se produce en forma de densas esteras originando bloques que impiden la penetración de la luz para las plantas sumergidas y también reduce niveles de oxígeno disuelto. La liberación de **aleloquímicos**¹ que antagoniza el

¹La **alelopatía**: Es un fenómeno biológico por el cual un organismo produce uno o más compuestos bioquímicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos. Estos compuestos son conocidos como **aleloquímicos** y pueden conllevar a efectos benéficos (alelopatía positiva) o efectos perjudiciales (alelopatía negativa) a los organismos receptores.

crecimiento de otros organismos y reduce la diversidad biológica, sin embargo, los informes de flora, fauna y microbiota indican que una amplia variedad de hongos ocupan nichos distintos en la planta. Una rica población de invertebrados y la fauna de vertebrados inferiores también se asocia con el Jacinto de agua, sin embargo, aún se requiere más investigación para establecer la anchura óptima del Jacinto de agua, franja que promueve la máxima abundancia y diversidad de macro invertebrados.



Figura 1.1: Especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).

La técnica de fitorremediación empleada para remover cadmio(II) y mercurio(II) en aguas contaminadas con estos metales, fue aplicada en nuestra investigación, empleando la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) debido a sus antecedentes de gran capacidad de absorción de estos metales pesados. La determinación de los metales en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) y en las soluciones residuales se llevaron a cabo mediante técnicas espectrométricas de absorción atómica e ICP óptico, basados en métodos estandarizados como el método Espectrométrico de absorción atómica de vapor frío (APHA 3112-b, 21st ed. 2005), método EPA 200.3: Digestión de metales en tejido por ICPOES/ICPOMS y absorción atómica, método para digestión por ácido nítrico (APHA 3030-e, 21st ed. 2005) y método digestión de metales (APHA 3030-d, 21st ed. 2005).

Los resultados obtenidos son satisfactorios para esta técnica ya que demuestran una vez mas la gran capacidad de absorción de metales pesados como cadmio (II) y mercurio (II) para un proyecto futuro de remoción de estos metales en aguas contaminadas.

1.1. JUSTIFICACIÓN

La sociedad a medida que ha avanzado en su desarrollo ha pasado de verter los residuos líquidos en los humedales y ha construido obras de concreto, especializadas para reducir las cargas contaminantes de los mismos. Las plantas de tratamiento de residuos líquidos son estructuras altamente demandantes de energía, por lo que en la actualidad son costosas de construir y operar. Con la moderna arquitectura se ha reiniciado la utilización de organismos vivos para descontaminación de residuos. Sin embargo, ya no se hace directamente en la naturaleza, sino bajo condiciones controladas, en estructuras construidas para cultivar los organismos vivos.

Actualmente, se han desarrollado diversas biotecnologías para el tratamiento de aguas residuales, tales como: Los sistemas de macrófitas en lagunas, macrófitas de flujo sub superficial y los de macrófitas en flotación entre otros .

Es por todo esto se pretende realizar el estudio de fitorremediación de metales pesados (cadmio y mercurio) con *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), ya que estudios previos han demostrado que esta especie es potencialmente capaz de absorber metales pesados.

Se han escogido el cadmio (II) y mercurio (II) por su alta toxicidad en los recursos hídricos que emplean los seres vivos y ecosistemas para su normal desarrollo.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos generales.

- ✓ Determinar las condiciones óptimas para la viabilidad de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) a una determinada concentración de nutriente, pH óptimo y concentración de metal, esto con la finalidad de aplicar la técnica de fitorremediación para Cd (II) y Hg (II) en soluciones de aguas dopadas con estos metales, esto como parte de nuestra tesis de investigación.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar la concentración óptima de los nutrientes para sostener la viabilidad de la planta estudiada.
- ✓ Determinar el pH óptimo sobre la viabilidad de la planta y la solubilidad del metal (Cd (II) y Hg (II)).
- ✓ Determinar la concentración óptima de los metales para la viabilidad de las plantas estudiadas.
- ✓ Determinar la concentración de Cd (II) y Hg (II), presentes en las muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) luego de ser sometidas en una solución de 5 ppm de estos iones metálicos.
- ✓ Determinar el porcentaje de sorción en las muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), luego de ser sometidas a una solución de 5 ppm Cd (II) y Hg (II).
- ✓ Determinar la concentración de Cd (II) y Hg (II), presentes en las soluciones residuales tratadas previamente con *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).
- ✓ Determinar el porcentaje de remoción de Cd (II) y Hg (II) en las soluciones que fueron sometidas con *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2 ANTECEDENTES

- ✓ El estudio titulado **"Contribución de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) cultivado bajo diferentes condiciones de nutrientes para los mecanismos de remoción de Fe en humedales artificiales"**.^[6] realizada por Maresh y colaboradores, emplean la macrófita *Eichhornia crassipes* para la remoción de hierro (Fe), de los recursos hídricos contaminados incluyendo las aguas subterráneas, debido a las diversas actividades antropogénicas. La eliminación de Fe se debió en gran parte a la fitorremediación principalmente a través del proceso de rizofiltración y precipitación química de Fe_2O_3 y $Fe(OH)_3$, seguido por la floculación y la sedimentación. Finalmente el estudio aclara que el Jacinto de agua crece en condiciones pobres de nutrientes y son ideales para eliminar Fe de las aguas residuales con un tiempo de retención hidráulica de aproximadamente 6 semanas.
- ✓ El estudio de **"Fitorremediación potencial de metales con *Eichhornia crassipes* en aguas costeras contaminadas"**,^[7] emplea *Eichhornia crassipes* para remover los metales, As, Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, V y Zn, siendo evaluados en el agua, en las raíces de las plantas y en los brotes. Los resultados revelaron que la planta acumula metales tóxicos como el Cr, Cd, Pb y As, tanto en la raíz y en el brote en un alto grado, lo que indica que la planta forma una gran cantidad de biomasa sobre la superficie del agua involucrando los procesos de fitoextracción y rizofiltración.
- ✓ El estudio realizado por Virendra y colaboradores, **"Acumulación de Cromo y zinc a partir de soluciones acuosas utilizando *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)"**.^[8] muestra la investigación sobre *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) para la eliminación de cromo (Cr) y zinc (Zn) a partir de soluciones de cada metal, logrando eliminar hasta un 95 % de zinc y 84 % de cromo durante el período de incubación de 11 días.
- ✓ El artículo titulado **"Arsénico acuático: Fitorremediación con macrófitas flotantes"**.^[9] muestra las especies Jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), lentejas de agua (*Lemna gibba*, *Lemna minor*, *Spirodela polyrhiza*), espinaca de agua (*Ipomoea aquatica*), helechos acuáticos (*Azolla caroliniana*, *Azolla filiculoides* y *Azolla pinnata*), el repollo de agua (*Pistia stratiotes*), maleza acuática (*Hydrilla verticillata*) y el berro (*Lepidium sativum*), las cuales se han investigado su capacidad de absorción de arsénico, para evaluar su potencial en la tecnología de fitorremediación. Esta investigación recomienda la macrófita acuática *Eichhornia crassipes* como un potencial para la fitorremediación de arsénico en aguas contaminadas.

CAPÍTULO III FITORREMEDIACIÓN

3 MARCO TEÓRICO

3.1. Fitorremediación

Los avances tecnológicos para sanear ambientes contaminados con metales pesados han conllevado al desarrollo de alternativas que se basan en el empleo de organismos para prevenir o restaurar daños provocados por acciones antropogénicas que alteran la estabilidad de los diferentes ecosistemas. En este sentido resalta la biorremediación, tecnología que consiste en el uso de sistemas biológicos naturales o mejorados genéticamente para degradar, transformar o eliminar sustancias peligrosas orgánicas e inorgánicas presentes en los suelos, aguas y aire. Estas tecnologías permitirían que las concentraciones del contaminante sean no detectables o estén por debajo de los límites establecidos como aceptables por las Agencias de control del medio ambiente. Lo cual permite la recuperación de los sitios contaminados y la protección del ambiente. ^[10,11,12] La fitorremediación es una de las vertientes de la biorremediación y puede considerarse una tecnología alternativa rentable y sostenible. ^[13] En esta se usan plantas ^[14] que almacenan y eliminan sustancias tóxicas, como metales, mediante procesos metabólicos. ^[15] Existen varias técnicas de fitorremediación aplicables a suelos contaminados con metales pesados: fitoextracción, fitoestabilización, fitodegradación, fitovolatilización y fitorrestauración. La fitoextracción o fitoacumulación, consiste en la absorción y translocación de los metales desde las raíces hasta las partes aéreas de las plantas.

Estas posteriormente se cortan y se incineran o son acumuladas para reciclar los metales. La fitoestabilización se basa en el uso de plantas tolerantes a metales para inmovilizarlos a través de su absorción y acumulación en las raíces o precipitación en la rizosfera, disminuyendo su movilidad y biodisponibilidad para otras plantas o microorganismos en suelos donde la gran cantidad de contaminantes imposibilita la fitoextracción. La fitodegradación y rizodegradación se refieren a la degradación de contaminantes orgánicos a través de las enzimas de las plantas, sus productos o por la acción de microorganismos rizosféricos. La fitorrestauración está referida a la reforestación de áreas contaminadas con especies resistentes de rápido crecimiento, que previenen la migración de partículas contaminantes y la erosión de los suelos. ^[16,17]

3.2. Aspectos generales de la fitorremediación

La fitorremediación es un proceso que tiene por objeto descontaminar los suelos valiéndose de especies vegetales capaces de extraer, metabolizar y acumular las sustancias tóxicas presentes en el ambiente edáfico. Para ello, suelen emplearse diferentes especies, con probada capacidad para sanear aguas y suelos contaminados, modalidad que gradualmente está consolidándose en forma creciente. Hasta ahora, se han identificado unas 400 plantas con distintos grados de eficiencia en la acumulación de sustancias tóxicas, las cuales han tenido éxito en la remoción de metales pesados provenientes de la actividad minera. Asimismo, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (derivados en su mayoría del petróleo) son contaminantes ambientales que se encuentran por doquier en las aguas y suelos debido a causas como derrames, degradación de fósiles y descargas de desechos domésticos e industriales. Es importante reconocer que la fitorremediación ofrece ventajas adicionales a la limpieza de suelos y mantos freáticos al emplear alguno de los siguientes mecanismos:

- ✓ Incremento de la actividad y población microbiana en el subsuelo, que eleva la cantidad de carbón orgánico.
- ✓ Mejoras en la aeración del suelo por la liberación de oxígeno por las raíces.
- ✓ Retardación del movimiento e interceptación de compuestos orgánicos y algunos metales.
- ✓ Estimulación de las transformaciones de compuestos tóxicos a compuestos de menor toxicidad.
- ✓ Captación de hidrocarburos volátiles por las hojas, que sirven de "tapadera" a los lugares contaminados.

En la década pasada la fitorremediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos, fue ampliamente estudiada. En muchas investigaciones se encontró que el limitante en la efectividad de esta tecnología es el transporte de los contaminantes desde la superficie externa hacia el interior de la planta. Investigaciones sobre el tema han encontrado que tres factores son los que controlan la cantidad de contaminante (orgánico) que la raíz puede tomar:

- ✓ Propiedades del compuesto.
- ✓ Condiciones ambientales.
- ✓ Características de la especie de planta.

Sobre éste último punto, los avances biotecnológicos posibilitan mejorar genéticamente a las plantas fitorremediadoras para que sean capaces de crecer en ambientes contaminados con uno o varios metales y sustancias peligrosas para la subsistencia de la vida. A posteriori, las sucesivas cosechas de las partes aéreas de dichas plantas con altas concentraciones de metales, pueden ser convenientemente tratadas como residuos o como fuente de metales. Esta técnica está despertando actualmente en el mundo mucho interés debido a su bajo costo, relativa efectividad así como su bajo impacto ambiental. Concretamente, una planta bioconcentradora limpia a través de diversos mecanismos, algunos no del todo conocidos, por los cuales determinados vegetales pueden sustraer del medio e incorporar cationes pesados o hidrocarburos de medios contaminados. La mayoría de ellos involucran complejos enzimáticos como los de metalotioneínas, que se combinan químicamente con los tóxicos y eventualmente los degradan. Por ejemplo, pueden cambiar el estado de oxidación de un catión, llevándolo a una forma menos tóxica y de esta manera se logra el objetivo de remediar la contaminación en un área determinada.

En general, las plantas fitoconcentradoras captan especies tóxicas a través de las raíces, y en cooperación con microorganismos del suelo (microflora). Una vez en el interior del vegetal, el tóxico o xenobiótico ingresado es metabolizado, siendo transportado a depósitos situados en el tallo y las hojas. Este proceso es guiado por genes de transporte específicos y tiene lugar sin alterar el ciclo vital del vegetal. Por supuesto, una vez concluido el tratamiento de limpieza de un suelo, se deben tener previstos sistemas de disposición final de los residuos de las plantas tratadas. Éstos suelen incluir, para volúmenes reducidos de vegetales, la combustión, y el reciclado/ recuperación de metales de las cenizas que se obtienen al finalizar la combustión.

3.3. Mecanismos de fitorremediación

En los últimos años se ha generado una terminología nueva basada en el papel que tienen las plantas durante el proceso de remediación, así como de los principales mecanismos involucrados, se han definido las siguientes estrategias de fitorremediación y se muestran en la figura 3.1.

3.3.1 Fitoextracción o fitoacumulación ^[18]

En esta estrategia se explota la capacidad de algunas plantas para acumular contaminantes en sus raíces, tallos o follaje, las cuales pueden ser fácilmente cosechadas. Los contaminantes extraídos son principalmente metales pesados, aunque también puede extraerse cierto tipo de contaminantes orgánicos y elementos e isótopos radiactivos. Generalmente, los sistemas de fitoextracción se implementan para extraer metales de suelos contaminados, por medio de plantas conocidas como metalofitas, es decir acumuladoras de metales; sin embargo, también pueden implementarse para tratar aguas residuales.

3.3.2 Rizofiltración ^[18]

Se basa exclusivamente en hacer crecer, en cultivos hidropónicos, raíces de plantas terrestres con alta tasa de crecimiento y área superficial para absorber, concentrar y precipitar metales pesados de aguas residuales contaminadas. Como puede apreciarse, las estrategias de fitorremediación hacen referencia a los mecanismos predominantes realizados por las propias plantas, pero también, en algunos casos, indican el papel que tienen las comunidades microbianas durante el proceso de remediación. Así, se hace evidente que la fitorremediación es un proceso complejo que involucra la participación de la comunidad microbiana asociada a su sistema de raíz. Cada una de las estrategias tiene condiciones particulares, determinadas principalmente por el tipo de contaminante y el sustrato a tratar; suelos, sedimentos o agua. Las medidas correctivas para contaminantes orgánicos incluyen la fitodegradación (o fitotransformación) y la fitoestimulación, mientras que para los metales pesados, incluidos los metaloides, radionúclidos y ciertos tipos de contaminantes orgánicos, se aplican la fitovolatilización, la fitoestabilización, la fitoextracción y la rizofiltración.

3.3.3 Fitoestabilización^[18]

Este tipo de estrategia utiliza plantas que desarrollan un denso sistema de raíz, para reducir la biodisponibilidad de metales y otros contaminantes en el ambiente por medio de mecanismos de secuestro, lignificación o humidificación. Las plantas ejercen un control hidráulico en el área contaminada, es decir actúan como una bomba solar que succiona humedad de los suelos debido a sus altas tasas de evapotranspiración. Puesto que este proceso mantiene también una humedad constante en la zona de la rizósfera, se presentan las condiciones adecuadas para la inmovilización de los metales.

Esto ocurre a través de reacciones químicas como la precipitación o formación de complejos insolubles o por mecanismos físicos, como la adsorción. En esta zona, los metales se fijan fuertemente en las raíces de las plantas o en la materia orgánica de los suelos, limitando así su biodisponibilidad y su migración vertical hacia los mantos freáticos.

3.3.4 Fitoestimulación^[18]

En este caso, los exudados de las raíces de las plantas estimulan el crecimiento de microorganismos capaces de degradar contaminantes orgánicos. Como parte de sus actividades metabólicas y fisiológicas, las plantas liberan azúcares simples, aminoácidos, compuestos alifáticos y aromáticos, nutrientes, enzimas y oxígeno, y los transportan desde sus partes superiores hasta sus raíces, favoreciendo el desarrollo de comunidades microbianas en el suelo circundante; particularmente hongos y bacterias, cuyas actividades metabólicas causan la mineralización de los contaminantes.

3.3.5 Fitovolatilización^[18]

Algunas plantas son capaces de volatilizar ciertos contaminantes, como mercurio y selenio, contenidos en suelos, sedimentos o agua. Tales contaminantes son absorbidos, metabolizados, transportados desde su raíz a sus partes superiores y liberados a la atmósfera en formas volátiles, menos tóxicas o relativamente menos peligrosas en comparación con sus formas oxidadas. La transformación de dichos elementos se efectúa básicamente en la raíz, y su liberación se lleva a cabo durante la transpiración.

3.3.6 Fitodegradación o fitotransformación ^[18]

Se basa en el uso de plantas para degradar o transformar en sustancias menos tóxicas diversos tipos de contaminantes orgánicos como hidrocarburos aromáticos polinucleares, hidrocarburos totales del petróleo, plaguicidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas), compuestos clorados, explosivos y surfactantes (detergentes). A través de reacciones enzimáticas que llevan a cabo plantas y microorganismos en la rizósfera, es decir, la zona del suelo estrechamente asociada con las raíces de las plantas, dichos contaminantes son parcial o completamente degradados o transformados. De esta manera son asimilados por las plantas y secuestrados en sus vacuolas o fijados a estructuras celulares insolubles, como la lignina.

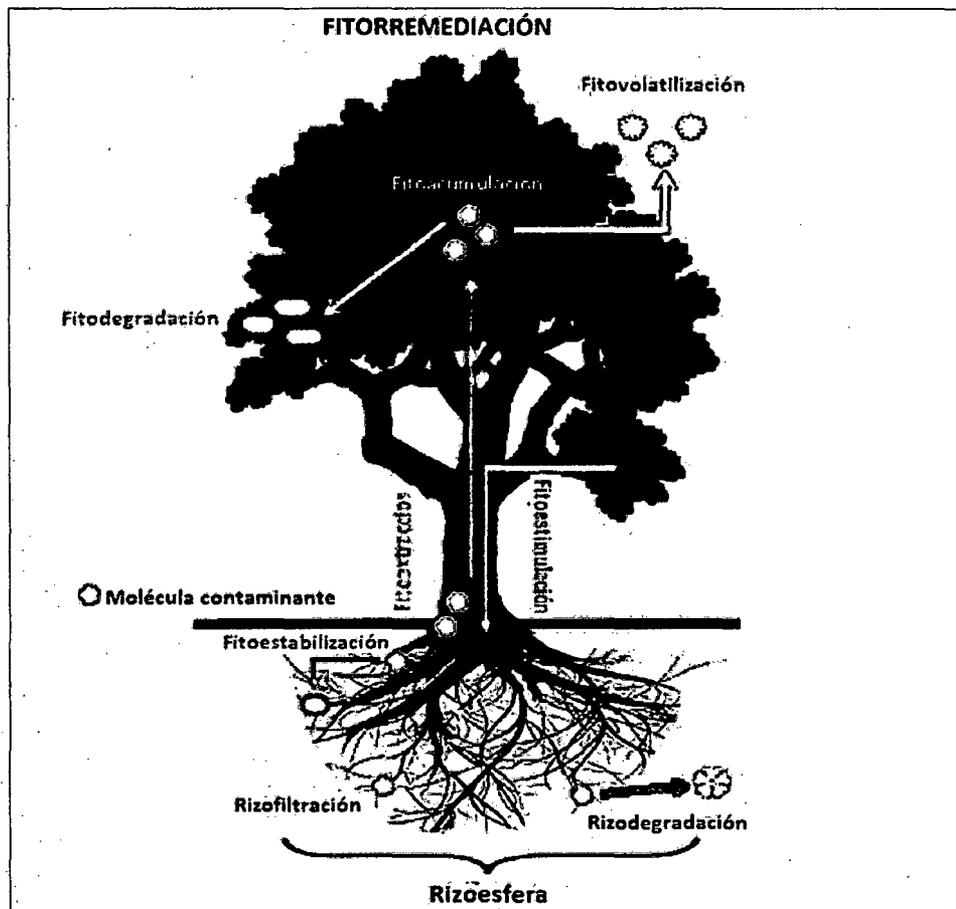


Figura 3.1: Diagrama que representa los tipos de fitorremediación de una planta. ^[43]

3.4. Ventajas y desventajas de la fitorremediación

El cuadro 3.1 muestra las principales ventajas que ofrece la fitorremediación, en comparación con otras tecnologías convencionales.

Cuadro 3.1: Ventajas y desventajas de la fitorremediación. ^[19,20,21]

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Es una tecnología sustentable. • Es eficiente para tratar diversos tipos de contaminantes <i>in situ</i>. • Es aplicable a ambientes con concentraciones de bajas a moderadas. • Es de bajo costo, no requiere personal especializado para su manejo ni consumo de energía. • Es poco perjudicial para el ambiente. • No produce contaminantes secundarios y por lo mismo no hay necesidad de lugares para desecho. • Tiene una alta probabilidad de ser aceptada por el público, ya que es estéticamente agradable. • Evita la excavación y el tráfico pesado. • Tiene una versatilidad potencial para tratar una gama diversa de materiales peligrosos. • Se pueden reciclar recursos (agua, biomasa, y metales) 	<ul style="list-style-type: none"> • Es un proceso relativamente lento(cuando las especies son de vida larga, como arboles o arbustos). • Es dependiente de las estaciones. • El crecimiento de la vegetación puede estar limitado por extremos de la toxicidad ambiental. • Los contaminantes acumulados en las hojas pueden ser liberados nuevamente al ambiente durante el otoño (especies perennes). • Los contaminantes pueden acumularse en maderas para combustión. • No todas las plantas son tolerantes o acumuladoras. • La solubilidad de algunos contaminantes pueden incrementarse, resultando en un mayor daño ambiental o migración de contaminantes. • Se requieren áreas relativamente grandes. • Pudiera favorecer el desarrollo de mosquitos(en sistemas acuáticos).

3.5. Tipos de contaminantes que se pueden eliminar

- ✓ Metales pesados (cromo, arsénico, cadmio, plomo, zinc, cobre, mercurio)
- ✓ Hidrocarburos derivados del petróleo
- ✓ Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX)
- ✓ Bifenilos policlorados (PCB)
- ✓ Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)
- ✓ Tricloroetileno (TCE) y otros compuestos organoclorados
- ✓ Residuos de pesticidas
- ✓ Escorias de municiones y explosivos
- ✓ Nutrientes (nitratos, amonio, fosfatos).

3.6. Aplicaciones de la fitorremediación en aguas ^[22]

3.6.1 Rizofiltración

Las raíces, ya sean acuáticas o terrestres, pueden precipitar y concentrar contaminantes tóxicos de efluentes, es en este punto donde se manejan las hipótesis sobre la importancia simbiótica entre un tipo de microorganismo y la raíz de la planta, en investigaciones recientes la modificación genética de cepas bacterianas, por ejemplo para la reducción de metales pesados o bien para la eliminación de aceites u otros ha evidenciado que no solamente la planta es capaz de retener o degradar un tipo de contaminante sino que además esta acción puede ser mejorada insertando microorganismos simbióticos específicos en la rizósfera de la planta. La técnica en sí implica la extracción de los contaminantes de soluciones acuosas a través de las raíces de las plantas, e implica hacer recircular el agua contaminada en piletones o un circuito en donde estuvieren ubicadas las plantas, las cuales una vez saturadas se irían cambiando para continuar con la técnica de eliminación.

3.6.1.1 Barreras hidráulicas

(In Situ). Series de árboles con alta capacidad de consumo de agua, sembrados en zonas de napas o acuíferos contaminados. Los árboles son capaces de extraer grandes cantidades de agua contaminada, inmovilizando los contaminantes.

3.6.1.2 Biosorción

(*Ex Situ*). Se utiliza material vegetal desecado y molido de manera que presenta una gran superficie de absorción. Se hace recircular el agua contaminada por columnas rellenas con este material que adsorbe los contaminantes. Una vez saturado, se recambia el adsorbente.

3.6.2 Coberturas vegetales

La disposición de coberturas vegetales en zonas problemáticas apunta fundamentalmente para:

- Control de infiltración del agua
- Saneamiento de suelos
- Barreras hidráulicas en aguas subterráneas

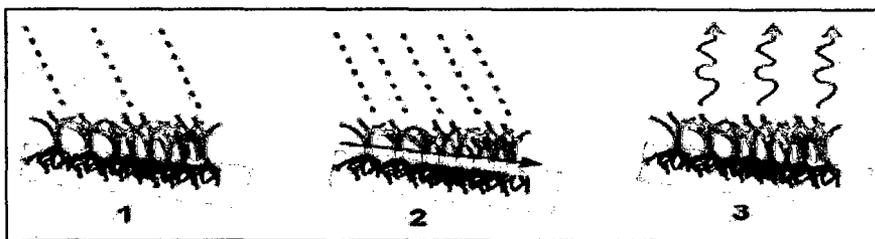


Figura 3.2: Interacción de la lluvia ácida en las plantas. [22]

Cuando se inicia la lluvia el agua es interceptada por las plantas (1), pero a medida que aumenta la intensidad de lluvia se excede la capacidad de interceptación de la misma por las plantas (2) y el agua se almacena en el subsuelo. Cuando cesa la lluvia y sale el sol las plantas regulan el exceso de agua por evapotranspiración, (3) liberando al medio ambiente.

3.6.3 Sistemas de humedales para tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales

Este sistema sería promisorio para las costas metropolitana y bonaerense, donde los niveles de contaminación son verdaderamente alarmantes.

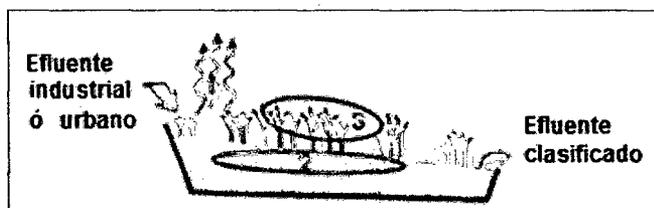


Figura 3.3: Plantas que absorben aguas subterráneas. [22]

El efluente contaminado se vierte sobre el terreno acondicionado con las plantas "saneadoras". Los contaminantes son eliminados por transpiración (1), por degradación en las raíces (2) o por acumulación en los tejidos de las plantas (3).

3.6.4 Contención de riberas

Un exceso de lluvias provoca el arrastre de abonos y pesticidas hacia las capas freáticas y hacia el río. El sistema de contención de riberas extrae de las capas freáticas los contaminantes, a la vez que sirve de sujeción del terreno y protege los caudales.

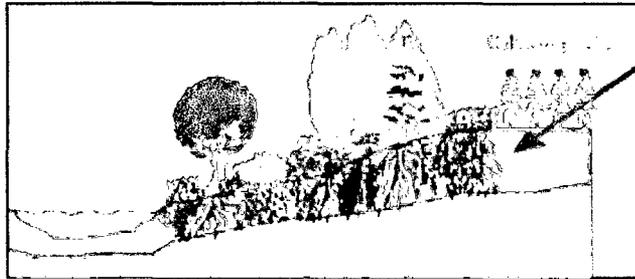


Figura 3.4: Plantas que absorben aguas subterráneas. [22]

3.6.5 Sistemas hidropónicos para el tratamiento de aguas

El agua bombeada permanece en el tanque el tiempo necesario para que las plantas absorban los contaminantes por las raíces y los degraden, permitiendo que el agua salga clarificada.

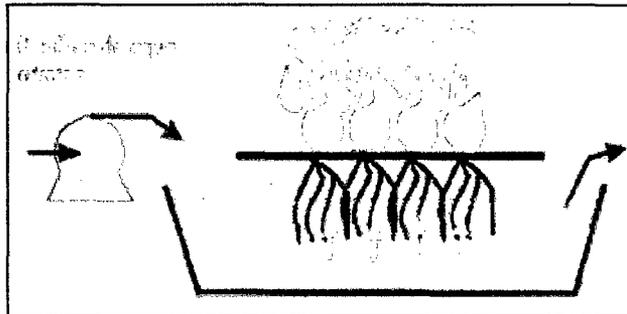


Figura 3.5: Cultivos hidropónicos. [22]

3.7. Toxicidad de cadmio y mercurio en las plantas

3.7.1 Toxicidad del cadmio en las plantas

Los efectos tóxicos del cadmio sobre las plantas, han sido ampliamente estudiados ^[23,24], sin embargo los mecanismos de su toxicidad aún no se conocen completamente. En general el Cadmio interfiere en la entrada, transporte y utilización de elementos esenciales (Ca, Mg, P y K) y del agua, provocando desequilibrios nutricionales e hídricos en la planta. ^[25,26,27] El Cd también reduce la absorción de nitratos y el transporte de los mismos de la raíz al tallo, además de inhibir la actividad nitrato reductasa² en tallos. ^[28] Las plantas expuestas a suelos contaminados con cadmio presentan modificaciones en la apertura estomática³, fotosíntesis y transpiración. ^[25] Uno de los síntomas más extendidos de la toxicidad por cadmio es la clorosis producida por una deficiencia en hierro, ^[24] fosfatos o por la reducción del transporte de Mn. ^[29] El tratamiento con cadmio produce reducción de la actividad ATPasa de la membrana plasmática, presenta alteraciones en la funcionalidad de la membrana plasmática ^[26,30,31] y desequilibrios en el metabolismo del cloroplasto, inhibiendo la síntesis de clorofila y reduciendo la actividad de enzimas implicadas en la fijación de CO₂. ^[32,33]

La toxicidad por metales pesados se debe en parte al estrés oxidativo producido por las especies de oxígeno reactivo (ROS) generadas a través de diferentes mecanismos dependiendo del metal de que se trate. ^[34] Los cationes metálicos Cd²⁺ y Pb²⁺ no experimentan cambios redox y por lo tanto, a diferencia del Fe²⁺ o Cu²⁺, no actúan directamente en la generación de ROS. Sin embargo, pueden actuar como prooxidantes a través de la reducción del contenido de GSH(glutación), necesario para la síntesis de PC_n (fitoquelatinas), disminuyendo así su disponibilidad para la defensa antioxidante. ^[35]

El estrés oxidativo producido por el cadmio se manifiesta por daños oxidativos a membranas tales como peroxidación lipídica ^[36,26,37] y también se han descrito daños oxidativos a proteínas por formación de grupos carbonilo. ^[38] Las actividades de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutación reductasa (GR), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD) y la catalasa (CAT), encargadas de la defensa celular frente a las ROS, experimentan reducciones o incremento de su actividad en función de la concentración de cadmio incluida en el medio de crecimiento, la duración del tratamiento, tipo de tejido y la especie vegetal que se trate. ^(28,24) En los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de los mecanismos íntimos implicados en la producción de ROS en respuesta al Cd. Como consecuencia de ello, se ha demostrado la producción de ROS en distintos compartimentos celulares (membrana plasmática,

² **Nitrato Reductasa:** Esta enzima participa en la asimilación de nitrato en plantas. Al ser la primera enzima es altamente regulada. El proceso de oxido-reducción ocurre en el citoplasma. El producto de la reacción es nitrito, el cual debe ser rápidamente movilizado al interior del plastidio para se generar amonio catalizado por la enzima nitrito reductasa, el cual es aceptado por glutamato.

³ **Apertura estomática:** Se da cuando a las células oclusivas llega agua procedente de las células adyacentes, se vuelven turgentes y sus paredes celulares se coan, se abre el estoma y los gases entran o salen a través ostiolo.

mitocondrias y peroxisomas) siendo la NADPH⁴ oxidasa una de las principales fuentes de ROS [38,39,40] En la Figura 3.6 se muestra un esquema que resume la respuesta de la planta al cadmio, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por distintos autores. [38,39] Según este esquema, el Cd podría inducir la NADPH oxidasa de membrana y las ROS que se formarían (O²⁻ y H₂O₂) podrían intervenir en la lignificación de la pared celular que actúa como barrera de entrada del metal.^[23] Las ROS pueden ser eliminadas por los sistemas antioxidantes pero cuando la intensidad y duración del tratamiento superan la barrera antioxidante, se produce un exceso de ROS que se traduce en daños oxidativos a membranas y proteínas. Los daños a membranas van acompañados de un incremento en la síntesis de etileno y del ácido jasmónico (JA), que junto con el H₂O₂ van a regular la expresión de un gran número de proteínas de defensa (HSPs, quitinasa o antioxidantes, entre otras). Recientemente se ha demostrado un importante papel regulador del NO en distintos procesos de desarrollo en vegetales. [41] El papel de esta molécula está siendo estudiado y parece ser que el Cd reduce considerablemente la acumulación de NO en tratamientos largos, pero aun no se conocen los mecanismos implicados en este proceso. [42]

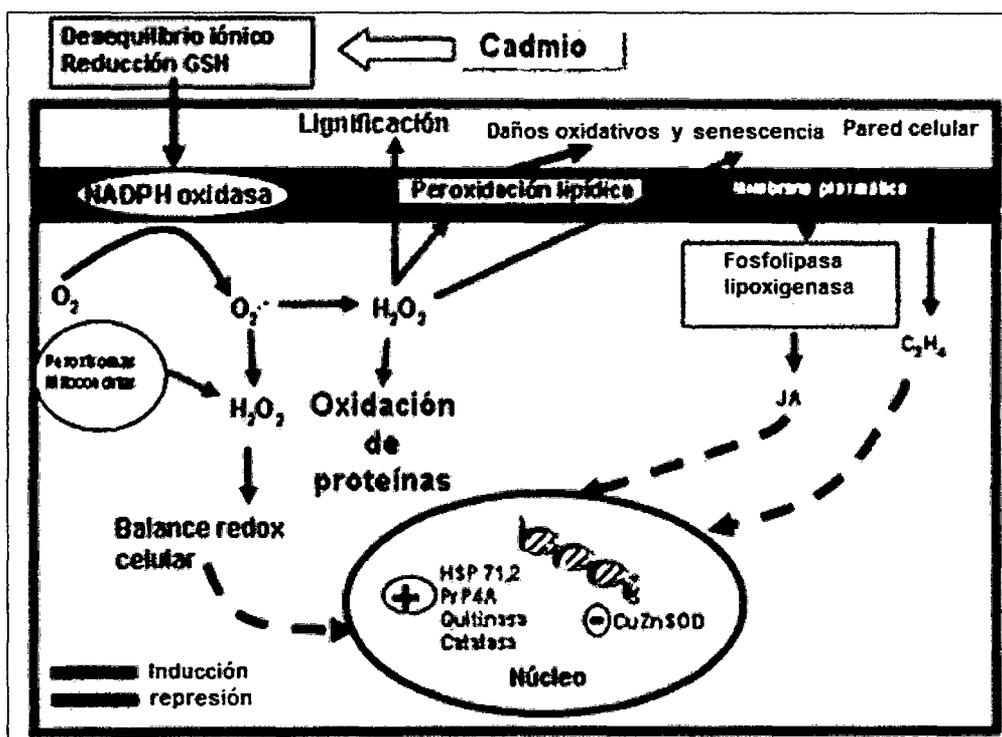


Figura 3.6: Esquema de la respuesta celular al cadmio: producción de ROS, daños oxidativos y señalización.^[94]

⁴ NADPH: La enzima NADPH oxidasa o dual oxidasa (DUOX), cataliza la reacción de oxidación del NADH o NADPH a NAD⁺ o NADP⁺ utilizando para ello oxígeno molecular y produciendo peróxido de hidrógeno. Utiliza como cofactores calcio, FAD y el grupo hemo.

3.7.2 Fuentes de contaminación de cadmio

El cadmio es un elemento no esencial y poco abundante en la corteza terrestre y a bajas concentraciones puede ser tóxico para todos los organismos vivos. La contaminación ambiental por cadmio ha aumentado como consecuencia del incremento de la actividad industrial que ha tenido lugar a finales del siglo XX y principios del siglo XXI, afectando de forma progresiva a los diferentes ecosistemas. [43] Entre los factores antropogénicos de contaminación de cadmio (Cd), caben destacar los siguientes factores (Figura 3.7):

Emisiones atmosféricas. Se originan a partir de las minas metalúrgicas, ya que el cadmio se extrae como subproducto del Pb, Zn, Cu y otros metales, las incineradoras municipales, y emisiones industriales procedentes de la producción de pigmentos para cristales, anticorrosivos, baterías de Ni/Cd, e insecticidas. [44]

Depósitos directos. El uso de fertilizantes fosfatados es la principal fuente de contaminación de Cd en suelos agrícolas. Otra fuente de Cd la constituyen los fangos procedentes de aguas residuales que se utilizan en agricultura. [62]

Contaminación accidental. Ocurre eventualmente debido a la contaminación de tierras por procesos industriales, residuos de la minería y corrosión de estructuras galvanizadas. Un ejemplo son los vertidos de Aznalcóllar que tuvieron lugar en 1998, en la provincia de Sevilla, como consecuencia de la rotura de una balsa que contenía concentraciones elevadas de metales pesados procedentes de una mina de esta localidad. [45]

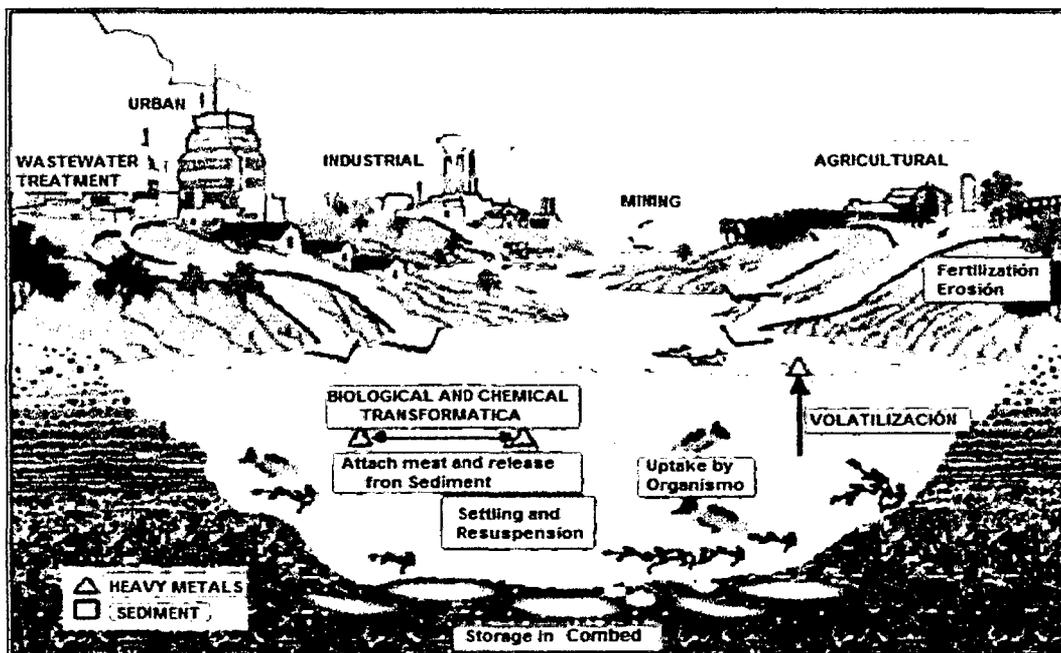


Figura 3.7: Fuentes de contaminación de cadmio y otros metales pesados. [96]

3.7.3 Toxicidad del mercurio en plantas

La presencia de trazas de mercurio en agua se debe principalmente a los residuos de actividades productivas como la minería y la industria, además de las debidas a causas naturales por fenómenos geológicos como la meteorización, la erosión de las rocas y la lixiviación. La interacción de este metal con el ecosistema depende de la forma y especie química en la que se encuentre, además de otros factores como el pH, las condiciones de óxido-reducción del agua, la presencia de sustancias orgánicas con capacidad de formar complejos químicos y diversos factores climáticos que potencian el estrés químico.

El mercurio es uno de los metales pesados que mayor preocupación está causando en el mundo por su acción sumamente tóxica para los organismos y para el hombre. Se considera poco peligroso en forma metálica y en sales minerales, pero en compuestos orgánicos su acción se torna muy tóxica para el hombre como último consumidor de pescados y mariscos, que tienen la propiedad de acumularlo en sus tejidos.

La agencia para la protección ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2005)^[46] considera que el berilio (Be) y el mercurio (Hg) son dos de los elementos más peligrosos, es decir, que son muy perjudiciales aun en pequeñas cantidades. De acuerdo con lo reportado por el consejo de defensa de los recursos naturales, el mercurio funciona como una neurotoxina una vez dentro del cuerpo humano, interfiriendo con el cerebro y el sistema nervioso. La exposición al mercurio antes del nacimiento y durante la infancia puede causar retraso mental, parálisis cerebral, sordera y ceguera. Incluso en dosis pequeñas, el mercurio puede afectar el desarrollo del niño, puesto que causa déficit de atención y problemas de aprendizaje. En los adultos, el envenenamiento por mercurio puede afectar adversamente la fertilidad y la regulación de la presión arterial, a más de causar pérdida de la memoria, temblores, pérdida de la visión y entumecimiento de los dedos de manos y pies.

El mercurio, cuando llega a la naturaleza y ha transcurrido un tiempo, es transformado a metilmercurio (CH_3Hg^+). La diferencia entre el mercurio simple y el metilmercurio es muy importante, ya que esta segunda molécula es una forma orgánica, que se acumula en el organismo, sobre todo en el sistema nervioso. Además, esta sustancia produce sinergia con otras sustancias, aumentando sus efectos nocivos. Este proceso de transformación a mercurio orgánico se llama metilación, por medio de la cual se da lugar a la movilización del mercurio.

El metilmercurio, al igual que otros compuestos organometálicos, es liposoluble, y, en consecuencia, presenta una elevada toxicidad, puesto que puede atravesar fácilmente las membranas biológicas y en particular la piel, y a partir de aquí sigue la incorporación del metal en la cadena trófica.

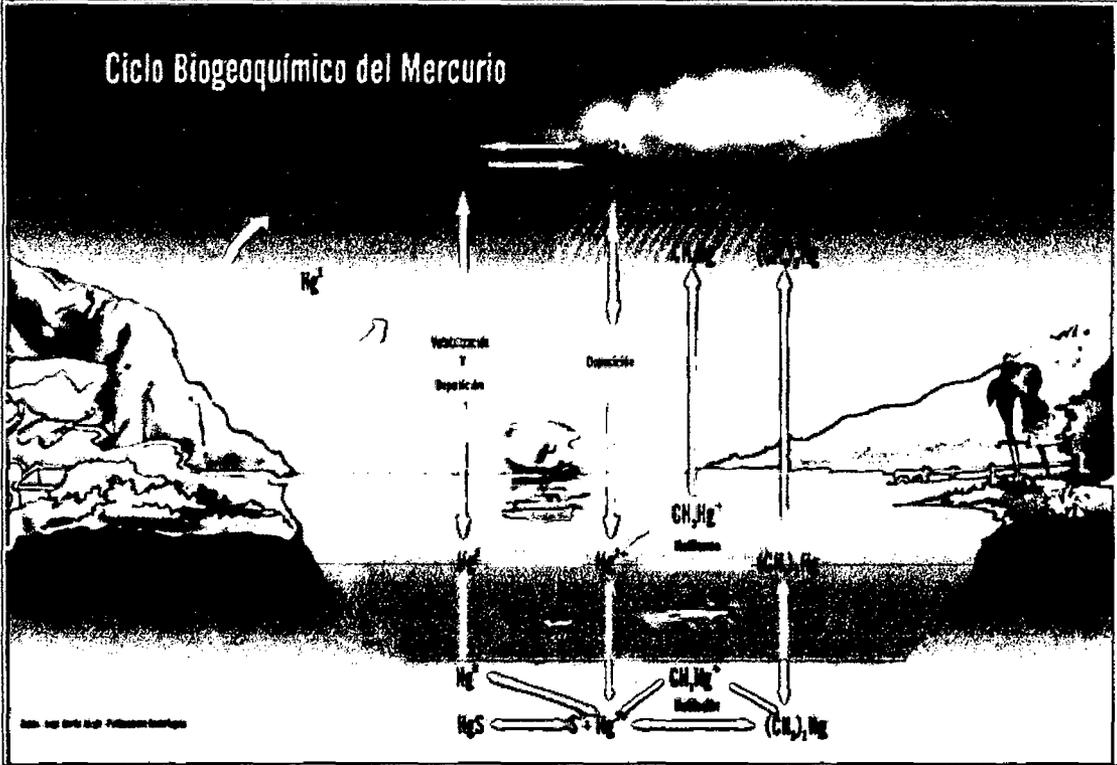


Figura 3.8: Ciclo biogeoquímico del mercurio.^[96]

3.7.4 Fuentes de contaminación del mercurio

(UNEP, 2002)⁴⁷. El mercurio es producido por la minería y la fundición del mineral de cinabrio. Se ha utilizado ampliamente en las plantas de cloro-álcali (producción de cloro e hidróxido de sodio), pero los diseños de plantas modernas ahora han hecho innecesaria grandes tiendas de mercurio. Una *miriada*⁵ de productos que contienen mercurio han estado en uso, incluyendo los compuestos en las pinturas como conservantes o pigmentos, en los equipos de conmutación eléctrica y las baterías, en el equipo de medición y control (termómetros y otros equipos médicos), en instrumentos de vacío de mercurio, como catalizador en procesos químicos, en el mercurio de cuarzo y las lámparas luminiscentes, en la producción y el uso de explosivos altos con fulminato de mercurio en las amalgamas de cobre/plata en los materiales de restauración dental, y como fungicidas en la agricultura (especialmente el tratamiento de semillas). Muchas de estas aplicaciones están siendo prohibidas o eliminadas. Según los datos de la EPA de los EE.UU., estos esfuerzos han sido beneficiosos, ya que las emisiones globales de mercurio de uso industrial en los Estados Unidos han caído 45 % desde 1990, y siguen disminuyendo. Uno de los usos del mercurio metálico líquido que se ha intensificado en las últimas décadas es la minería artesanal de oro. Los depósitos aluviales de las partículas finas de oro se extraen a menudo utilizando mercurio. Las partículas de oro se disuelven en el mercurio como amalgama, y el mercurio es eliminado posteriormente por calentamiento con un gas de la antorcha. Por tanto, este uso expone la minera de oro a una cantidad sustancial de vapor de mercurio, y también conduce a la extensa liberación de mercurio en confinados y zonas ecológicamente sensibles. El consumo anual de mercurio en dichas operaciones mineras es de 650 toneladas, principalmente en Asia, África central, y América latina.

El mercurio se emite a la atmósfera por "desgasificación" de la superficie de la tierra y por la resuspensión de las partículas que contienen mercurio previamente depositado. Se estima que las emisiones de los volcanes y otras fuentes naturales que constituyen aproximadamente 1 000 toneladas al año. Una emisión anual adicional de cerca de 2500 toneladas proviene de fuentes antropogénicas, siendo la principal fuente de producción de energía a partir de combustibles fósiles, especialmente los carbones con alto contenido de mercurio.

Otra consecuencia de esta práctica es la contaminación del suelo, que puede permanecer contaminado durante muchas décadas. Algunos sitios de extracción de oro en los Estados Unidos (por ejemplo, Carson River, Nevada) se reconocen ahora como altamente contaminados con mercurio, con un estimado de residuos de mercurio superiores a 6 000 toneladas.

La deposición de lodos de depuradora y contaminación de otras actividades industriales implican a menudo sales de mercurio de baja solubilidad (es decir, sulfuros). Implicaciones para la salud ecológica y humana del mercurio inorgánico en el medio ambiente depende de la intensidad de la metilación del mercurio.

⁵ *Miriada* : S. f. *culto* Infinidad, sinfn, sinnúmero.

Estudios recientes utilizando isótopos estables de mercurio^[4] han documentado que la sedimentación de la suspensión de mercurio en el aire en los ecosistemas de agua dulce dentro de varios meses se acumula en los peces en el forma de metilmercurio.

Compuestos organomercuriales ahora sólo encuentran un uso limitado como fungicidas, pero el metilmercurio fue utilizado ampliamente para este fin en el pasado, hasta que los efectos ambientales fueron descubiertos. El metoximetilmercurio menos tóxico, todavía se utiliza a veces para el tratamiento de la madera o en la industria de la pasta de papel y como un agente antislime. El *timerosal* (etilmercurio salicilato) ha sido ampliamente utilizado como conservante en la industria farmacéutica, por ejemplo, en las vacunas, pero ahora se está eliminando.

Los diversos usos del mercurio y compuestos de mercurio como resultado de la exposición ocupacional en una amplia gama de ocupaciones, en la mayoría de los casos sólo involucra vapor de mercurio y compuestos inorgánicos. El uso industrial del mercurio también puede dar lugar a emisiones al medio ambiente debido a la evaporación de las emisiones de aguas residuales. Problemas localizados relacionados con la contaminación de los sistemas de ríos y bahías han sido causados por la contaminación de las plantas de cloro-álcali, industrias de papel y celulosa, y las fábricas de pesticidas. En Japón, la bahía de Minamata se convirtió gravemente contaminado en una fábrica que utiliza metilmercurio como un catalizador en la producción de acetaldehído. Además, las emisiones en el aire de carbón, plantas de energía e incineradores pueden causar la contaminación de lagos y ríos. El mercurio elemental puede oxidarse a Hg^{2+} , que a su vez puede convertirse en compuestos metilados de metilmercurio por reacciones químicas o microbiológicas en el medio ambiente acuático. La flora bacteriana intestinal de varias especies animales, incluidos los peces, es también, aunque en un grado mucho menor, capaz de convertir mercurio iónico en compuestos metil mercurio.^[5] El metilmercurio se acumula en los peces y mamíferos marinos y alcanza sus mayores concentraciones en grandes especies depredadoras en la parte superior de la cadena alimentaria acuática. Por este medio, que entra en la dieta humana. Ciertos microorganismos pueden dimetilar el metilmercurio, por ejemplo, en el intestino, mientras que otros pueden reducir Hg^{2+} a Hg. Por lo tanto, se cree que los microorganismos a desempeñar un papel importante en el destino del mercurio en el medio ambiente y en que afecta a la exposición humana.

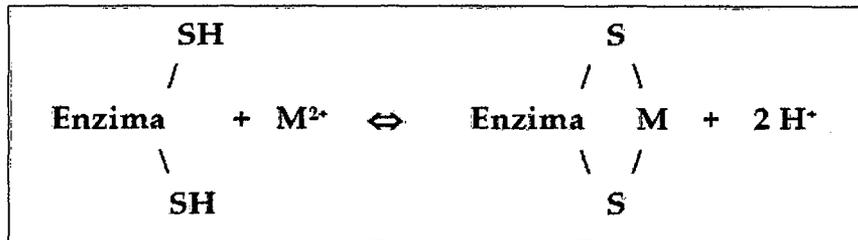
En la siguiente figura 3.9, se aprecia el ciclo del mercurio que finalmente llega al hombre y finalmente la contaminación inevitable.



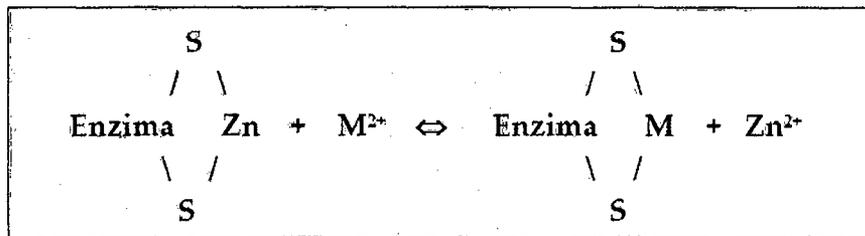
Figura 3.9: Ciclo de contaminación del mercurio.^[97]

3.7.5 Efectos tóxicos comunes por elementos pesados.

- Un buen número de elementos pesados son tóxicos por interacción con moléculas del organismo que contiene azufre.
- Algunos compuestos bioquímicos importantes del organismo poseen grupos S^{2-} y HS^- (sulfhidrido) tales como proteínas estructurales y funcionales (enzimas).
- A los ligandos que poseen grupos sulfhidrido, RSH, se les denomina tioles o mercaptanos (mercurio captadores).
- La forma principal en la que estos elementos ejercen su toxicidad es la inhibición de la función enzimática (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}).



o bien sustituir a elementos esenciales como el Zn^{2+} ,



- La cinética de esta reacción viene controlada por factores tales como la solubilidad de la especie que libera el ión metálico, la energía del enlace M-S y la accesibilidad del metal al nucleófilo.

Una guía útil sobre la influencia biológica del metal son las constantes de estabilidad de complejos organometálicos usuales en el organismo.

Cuadro 3.2: Constantes de estabilidad aparente para Hg, Cd, Pb y diferentes grupos bioquímicos

Grupo	Log K (pH=7)		
	Hg	Cd	Pb
Carboxílico	5,6	1,8	1,9
Amino	6,0	0,3	0,5
Imidazol	3,7	2,7	2,2
Tiol	10,2	5,6	4,9
Fosfato	---	2,7	3,1
Cloruro	7,3	2,0	1,6

- Se muestra la afinidad de estos metales por el azufre comparados con otros grupos donadores de electrones (-O, -N, PO₄³⁻, Cl).
- La proteína metalotioneína es una protección efectiva contra algunos metales pesados tales como Pb, Cd y Hg. Un tercio de los aminoácidos de esta proteína son cisteína, un aminoácido de los veinte aminoácidos (figura 3.10.a) que utilizan las células para sintetizar las proteínas.

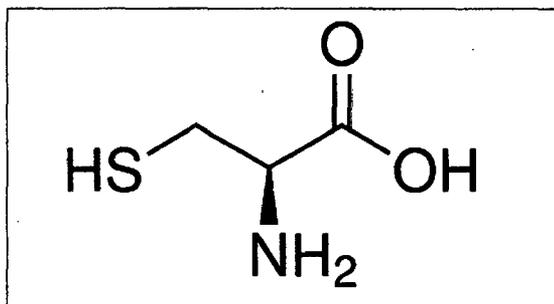


Figura 3.10 : Estructura química de la cisteína.

CAPÍTULO IV
Eichhornia crassipes
(Jacinto de agua)

4 Tipo de plantas acuáticas⁶

Con base en sus formas de vida, las plantas utilizadas en los sistemas de fitorremediación acuática se clasifican en tres grupos:

4.1. Emergentes

La raíz de estas plantas está enterrada en los sedimentos y su parte superior se extiende hacia arriba de la superficie de agua. Sus estructuras reproductoras están en la porción aérea de la planta. Ejemplos: carrizo (*Phragmites communis*), platanillo (*Sagittaria latifolia*) y tule (*Thypha dominguensis*).

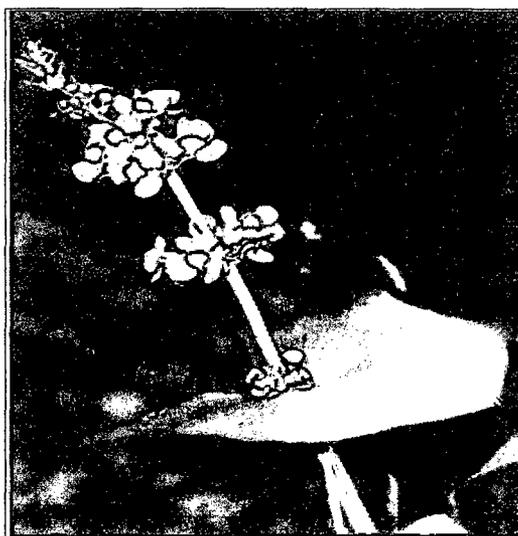


Figura 4.1: *Sagittaria latifolia* (Platanillo).^[99]

4.2. Flotantes

Se subdividen en dos grupos:

4.2.1 Plantas de libre flotación (no fijas)

Sus tallos y hojas se desarrollan sobre la superficie del agua. Sin embargo, sus raíces no están fijas en ningún sustrato y cuelgan en la columna de agua. Sus estructuras vegetativas y reproductivas se mantienen emergentes. Ejemplos: lirio acuático *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), lenteja de agua (*Lemna* spp. y *Salvinia mínima*).

⁶ **Planta acuática** : Las plantas acuáticas o macrófitas (también llamadas plantas hidrofíticas o hidrofitas o plantas hidrofílicas o higrofitas) son plantas adaptadas a los medios muy húmedos o acuáticos tales como lagos, estanques, charcos, estuarios, pantanos, orillas de los ríos, deltas o lagunas marinas



Figura 4.2: *Lemna spp.* (Lenteja de agua).^[100]

4.2.2 Plantas de hoja flotante (fijas)

Tienen sus hojas flotando sobre la superficie del agua, pero sus raíces están fijas en los sedimentos.

Ejemplo: nenúfares (*Nymphaea elegans* y *Nymphoides fallax*).



Figura 4.3: *Nymphaea elegans* (Nenúfares).^[101]

4.2.3 Sumergidas

Se desarrollan debajo de la superficie del agua o completamente sumergidas. Sus órganos reproductores pueden presentarse sumergidos, emerger o quedar por encima de la superficie de agua. Ejemplos: bejuquillo (*Cerathophyllum demersum*), hidrilla o maleza (*Hydrilla verticillata*) y pastos (*Phyllospadix torreyi*).



Figura 4.4 : *Cerathophyllum demersum* (Bejuquillo)^[102]

4.3. *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

4.3.1 Taxonomía y características morfológicas de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

- ✓ **Reino:** Plantae
- ✓ **Subreino:** Traqueobionta (plantas vasculares)
- ✓ **Superdivisión:** Spermatophyta (plantas con semillas)
- ✓ **División:** Magnoliophyta (plantas con flor)
- ✓ **Clase:** Liliopsida (monocotiledóneas)
- ✓ **Subclase:** Liliidae
- ✓ **Orden:** Liliales.

El Jacinto de agua es una planta flotante compuesta por una larga ronda de esponjoso tallos, sus hojas son de color verde profundo, grande y erecto, las raíces son variables en longitud de unos 10 cm a 90 cm de largo. Los rizomas son generalmente de 1 a 25 cm de largo, de vez en cuando producen entrenudos.

Esta planta originalmente es natural de Turquía y Líbano. Factores importantes para el crecimiento de esta planta se indican a seguir:

- ✓ **Suelos:** La tierra debe presentar un buen drenaje para no producir encharcamientos. Una mezcla de arena de río-mantillo-sustrato universal en la proporción 1-2-4 en volumen. La distancia de separación entre bulbos debe ser de 10 cm. Si se ponen directamente en el jardín, el mes más adecuado para la plantación es septiembre, para que así cuando llegue el frío invernal ya tengan raíces y puedan soportarlo. Si se ponen en macetas, se pueden plantar incluso en diciembre, pero ahora estos tiestos hay que protegerlos del frío extremo, dejándolos en el interior de la casa (mejor que sea un sitio oscuro y fresco), cuando el tallo asome por encima de la tierra habrá que sacarlos para que les dé el sol, pero por la noche hay que volver a guardarlos si las temperaturas son muy bajas y continuar así hasta que hayan desarrollado bien el tallo y las raíces. Son plantas que soportan el frío, pero que no sea muy fuerte.
- ✓ **Riegos:** Hay que dejar que la tierra se seque entre riego y riego, una excesiva humedad provocaría el espigamiento de la planta, es decir su alargamiento, perdiendo por tanto su aspecto compacto y su forma natural.
- ✓ **Humedad:** No hace falta pulverizar ni las hojas ni las flores.
- ✓ **Cuidados especiales:** Estas plantas agotan las reservas del suelo donde se encuentran, por lo que no conviene plantarlas dos años seguidos en el mismo sitio. Por tanto, tampoco conviene dejarlos enterrados de un año para otro. Si necesitamos ese espacio para poner otra planta, tenemos que sacar todo el conjunto; hojas, bulbo, raíces y la tierra pegada a éstas, con cuidado y llevarlo a algún sitio donde puedan las hojas marchitarse.

Las plantas acuáticas, denominadas también macrófitas, cumplen un papel muy importante en los ecosistemas acuáticos. Brindan directa o indirectamente alimento, protección y un gran número de hábitats para muchos organismos de estos ecosistemas. Muchas de estas plantas son útiles para el ser humano, puesto que sirven de alimento, son materia prima para la industria y se usan en procesos de biorremediación, ya que pueden absorber algunas sustancias disueltas y brindar oxígeno mediante la fotosíntesis. Sin embargo, en algunos cuerpos de agua artificiales podrían crear problemas, porque pueden interferir con el uso que le da el hombre a esa agua al obstruir su flujo o la navegación y al crear ambientes propicios para plagas, enfermedades y vectores que afectan la salud humana .

Las macrófitas ocupan diversas zonas de los ecosistemas acuáticos. Dentro del grupo de plantas flotantes es frecuente observar en lagunas o en las áreas de flujo lento en ríos y quebradas.



Figura 4.5: Humedales donde crece *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) en el distrito de Carabaylo.

4.4. Mecanismos de tolerancia a metales pesados

Los mecanismos de tolerancia que han desarrollado las plantas para resistir y sobrevivir a la exposición a metales pesados involucran estrategias de exclusión, mineralización, reducción, solubilización, quelación, redistribución y acumulación. La *exclusión* involucra un sistema de reflujo o liberación de metales desde el interior de la planta hasta el exterior, para evitar o minimizar la acumulación en sus tejidos. La *mineralización* reduce la biodisponibilidad de los metales, que por tanto no pueden ser absorbidos. La solubilización está relacionada con la transformación del metal insoluble a una forma soluble, es decir, su transformación de una forma no asimilable a una asimilable. La *reducción* implica la transformación de especies químicas altamente tóxicas a especies menos tóxicas (por ejemplo cromo VI a cromo III), las cuales pueden entonces ser asimiladas y metabolizadas por las plantas. Una vez dentro del organismo, las especies metálicas individuales experimentan una biotransformación al ser acomplejadas o "secuestradas" por un ligando existente o sintetizado. Esta estrategia, conocida como quelación, es uno de los mecanismos de detoxificación recurrentes en las plantas. La palabra quelación (del griego chelé, "pinza" o "garfio") describe la formación de un complejo entre el metal y el ligante, en donde este último, en este caso una molécula orgánica, tiene varios sitios de unión que le permiten sujetar fuertemente un átomo central único en este caso el metal, formando un complejo muy estable que puede ser transferido y acumulado en las vacuolas de la planta. De esta manera, el metal se encuentra "secuestrado" y no está disponible para ejercer su toxicidad. En general, los mecanismos de tolerancia son diferentes entre las distintas especies de plantas y estarán determinados por el tipo de metal. En la figura 2.6, se ilustra el proceso de detoxificación de cromo efectuado por el lirio acuático, de acuerdo con los resultados.^[48]

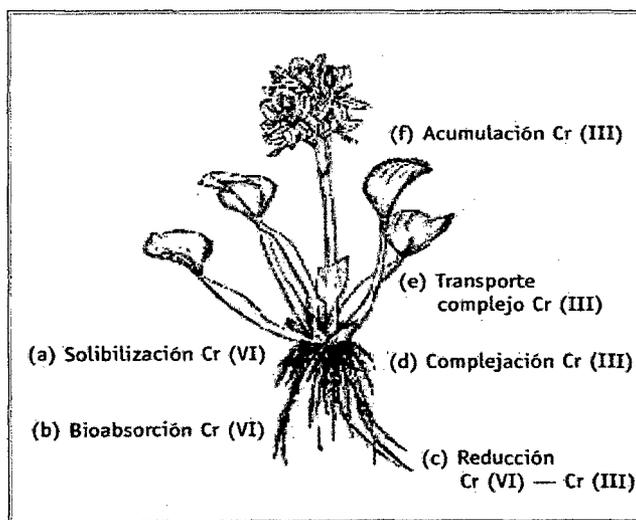


Figura 4.6 : Mecanismo de detoxificación de cromo, llevado a cabo por *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).^[48]

4.5. Componentes de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Entre los componentes quelantes producidos por las plantas se encuentran los ácidos orgánicos, particularmente citrato, oxalato y malato; algunos aminoácidos, principalmente histidina, cisteína metalotioneínas y fitoquelatinas, siendo los dos últimos los más importantes.

4.5.1 Cisteína

La cisteína (Cys) es uno de los veinte aminoácidos (figura 3.10.a) que utilizan las células para sintetizar las proteínas. A pesar de su abundancia en la forma enlazada, solo una baja fracción de Cys libre está presente en las células o en los flujos extracelulares^[49]. Las excepciones se producen en algunas enfermedades metabólicas (cistinosis y cistinuria) donde el disulfuro cistina se acumula en los tejidos o se excreta en cantidades anormales.

El azufre para la síntesis de cisteína proviene del azufre inorgánico, sulfuro y sulfato. Las plantas y los microorganismos utilizan estas fuentes para obtener el azufre de Cys en reacciones de reducción. En cambio, los animales que son incapaces de reducir sulfuro o sulfato obtienen la Cys directamente de la absorción y la reducción subsiguiente de la cistina formada en la hidrólisis de las proteínas de dieta, o también como producto de biosíntesis a partir del aminoácido metionina (HCys). El último proceso en las plantas y en los microorganismos esta invertido con la finalidad de obtener la Met.^[50]

4.5.2 Glutación

El glutación (GSH) es el tiol no proteico más abundante (figura 4.7); su concentración en las células es, como mínimo, un orden de magnitud más alta que la de otros tioles.^[51] El GSH es un tripéptido con la estructura γ -glutamil-cistenil-glicina (γ -Glu-Cys-Gly). Los animales, las plantas y los microorganismos tienen capacidad de sintetizarlo y promover su disociación continua. A pesar de tendencia a oxidarse, mayoritariamente se mantiene en la forma reducida. Su biosíntesis comprende la asociación de los tres aminoácidos con la participación de las moléculas de ATP y Mg^{2+} (estudios *in vitro*). La síntesis tiene lugar en dos etapas, con la formación de γ -glutamil-cistena (bajo control de la enzima γ -glutamil-cistena sintetasa) y la subsiguiente formación del GSH (bajo control de la glutación sintetasa).

El GSH actúa como ligando polidentado, ofreciendo un gran número y variedad de posibles sitios de enlace: Dos oxígenos carboxílicos, tres nitrógenos correspondientes a un grupo amino y dos grupos amida, y un grupo tiol. Sin embargo, debido a su estructura no todos sus potenciales sitios de unión pueden estar simultáneamente coordinados al mismo ion metálico. En consecuencia, su química de coordinación es complicada, ya que se caracteriza por la formación de complejos protonados y polinucleares.

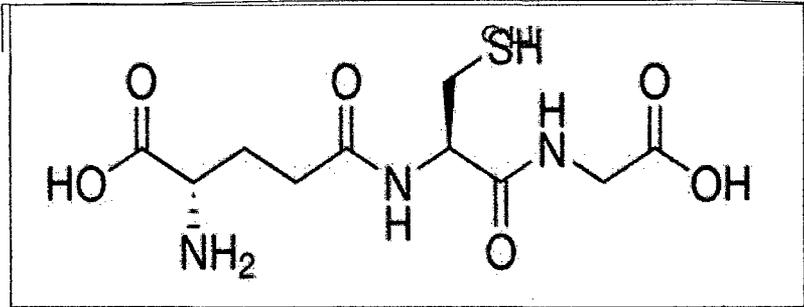


Figura 4.7: Estructura química del glutatión (GSH). [61]

4.5.3 Las metalotioneínas

Son polipéptidos ricos en cisteína [62] codificados genéticamente. Se conocen también como proteínas de bajo peso molecular que pueden sintetizarse por las bacterias, plantas, hongos, invertebrados y mamíferos. [60] Tienen una marcada afinidad por las formas iónicas de zinc, cadmio, mercurio y cobre. Estas proteínas contienen largas fracciones de residuos de cisteína y muestran alto contenido metálico con iones coordinados en grupos metal-tiolato. Aún no se ha determinado con precisión cuál es la función biológica de las metalotioneínas en las plantas. Sin embargo, parece que están involucradas en el metabolismo y la homeostasis de los metales esenciales, más que en la detoxificación de metales pesados. [63]

La función de las MTs en plantas todavía no alcanza a ser comprendida, debido a las dificultades para obtener las MTs purificadas, debido a la tendencia de hidrolizarse, particularmente en la región entre las Cys, en la secuencia de la proteína. Sin embargo, están siendo propuestas varias funciones de las MTs en las plantas, por ejemplo: Destoxicación de metales (principalmente Cu), formación de complejos con Zn en el citosol, secreción de metales a través de los tricomas en las hojas. [64]

En la figura 4.8 se muestra: A, la estructura lineal de la molécula de metalotioneína formada por 61 aminoácidos, veinte de ellos cisteínas, cada una de ellas como un grupo azufrado negativo que puede unir iones o agrupamientos positivos inorgánicos y orgánicos. B, estructura nativa globular con dos agrupamientos moleculares de la metalotioneína con siete iones cadmio (II). El extremo N-terminal con metionina-N-acetilada (5-6 unidades glicocola) y alanina-carboxiterminal.

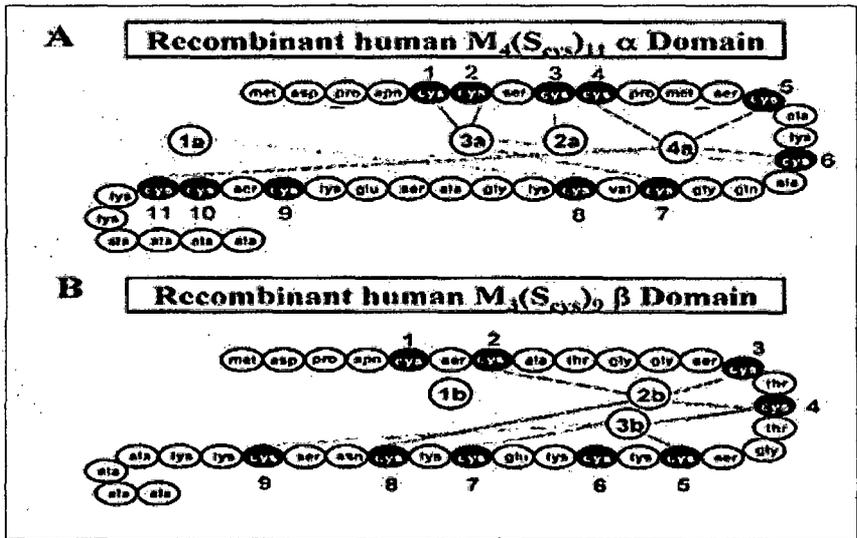


Figura 4.8: Secuencia de metalotioneína (MT) humana, con 11 cisteínas en el dominio alfa y 9 cisteínas en el dominio beta. [103]

4.5.4 Las fitoquelatinas

Son péptidos ricos en cisteína sintetizados enzimáticamente que consisten de tres aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina (figura 4.19), de bajo peso molecular (<10KDa). Se derivan del glutatión y se polimerizan para formar péptidos secuestradores de metales pesados en muchas especies de plantas y microorganismos.

La síntesis de fitoquelatinas es citoplasmática, comienza con la respuesta de la planta a un metal pesado por la activación de la enzima fitoquelatina sintasa, que actúa sobre un sustrato de glutatión para producir fitoquelatinas.^[55] Además, la reacción catalizada por la enzima no requiere del ATP, solo necesita de la presencia de un metal pesado en altas concentraciones, el cual actúa como un activador esencial de la enzima.^[53]

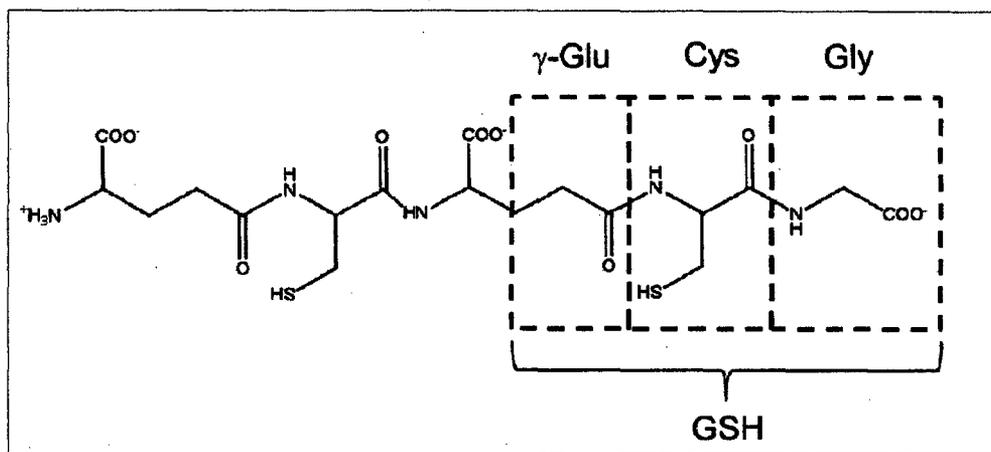


Figura 4.9 : Representación de la fitoquelatina PC₂ en que se destacan los fragmentos más relevantes : GSH (glutatión), Glu (ácido glutámico), Cys (cisteína) y Gly (glicina).^[53]

A pesar de que en los últimos años se ha incrementado el número de estudios, no se puede establecer aún con claridad cuál es el papel de las fitoquelatinas (FQ_n). Sin embargo, se asume que su principal función tiene que ver con la detoxificación de metales no esenciales y metaloides con marcada afinidad por el azufre. Igualmente, las evidencias sugieren que las fitoquelatinas también están involucradas en la homeostasis de los metales esenciales (micronutrientes), particularmente de hierro, cobre y cinc.

Se sabe que una amplia variedad de metales pueden inducir la formación de fitoquelatinas, entre ellos el cadmio, níquel, cobalto, plomo, plata, cinc, cobre, aluminio, arsénico, selenio y mercurio.^[56] Sin embargo, la quelación de metales por fitoquelatinas sólo ha sido verificada para unos cuantos elementos y en un número reducido de plantas. En la figura 4.10, se representa esquemáticamente el complejo fitoquelatina-cadmio, que involucra cuatro fitoquelatinas con tres cadenas de dipéptidos, en donde se puede apreciar que los residuos de cisteína se unen a los iones de cadmio.

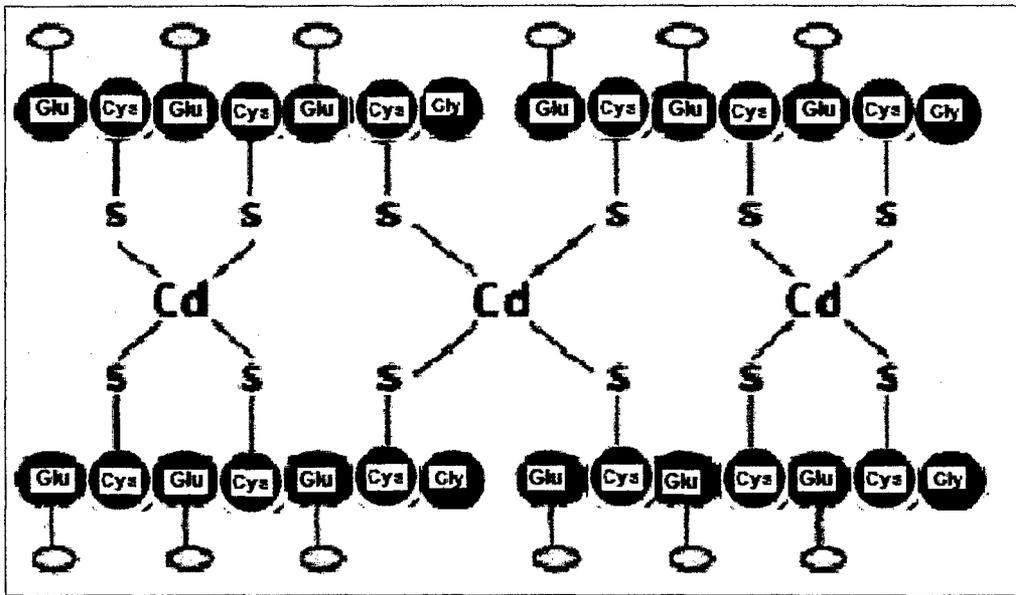


Figura 4.10: Representación esquemática del complejo fitoquelatina-cadmio. ^[104]

El mecanismo de detoxificación de metales es más complejo que una simple quelación. El ión puede activar la enzima fitoquelatina sintetasa, iniciando la formación de las fitoquelatinas, las cuales lo acompañarán y entonces presumiblemente será transportado a las vacuolas, donde posiblemente formará una agregación más compleja con sulfuros o ácidos orgánicos. Si las plantas no fabrican las fitoquelatinas, los metales inhibirán su crecimiento y consecuentemente morirán.

La mayoría de los estudios sobre fitoquelatinas y metalotioneínas se han concentrado en plantas terrestres hiperacumuladoras de metales y en plantas cultivables de importancia económica. Sin embargo, a pesar de ser las más estudiadas, aún quedan muchas interrogantes por resolver sobre sus mecanismos de tolerancia y detoxificación. Cobbett ^[87] señala que aún falta por responder el papel de la fitoquelatina sintetasa y de las fitoquelatinas en diferentes especies, y que el conocimiento de las bases moleculares de la biosíntesis de fitoquelatinas será útil para optimizar el proceso de la fitorremediación.

Respecto a las plantas acuáticas, hasta la fecha sólo se ha demostrado la síntesis de fitoquelatinas en algas marinas y de agua dulce. Aun cuando se han realizado numerosos estudios con el lirio (*Eichhornia crassipes*) y la lenteja de agua (*Lemna minor* sp), plantas comúnmente empleadas en los sistemas de fitorremediación acuáticos, poco se conoce sobre sus mecanismos fisiológicos involucrados en el proceso de detoxificación de metales pesados, debido a que la mayoría de las investigaciones se han limitado a determinar la capacidad de bioabsorción, acumulación y tolerancia.

4.5.5 Ácidos orgánicos y aminoácidos

Debido a la reactividad de iones metálicos con S, N, y O los ácidos carboxílicos y aminoácidos representan ligantes potenciales de metales pesados. Citrato, malato y oxalato, están siendo empleados en varios procesos, incluyendo tolerancia a metales pesados, transporte de metal a través del xilema y secuestro vacuolar.^[54] El ácido cítrico es considerado el mayor ligante de Cd^{2+} cuando este se encuentra a bajas concentraciones,^[57] forma complejos con Ni^{2+} en plantas hiperacumuladoras y contribuye a la acumulación y tolerancia del Zn.^[58,59] Wagner y colaboradores destacan la importancia del malato como quelante de Zn citosólico en plantas tolerantes a este metal

4.6. Toxicidad de metales pesados en plantas: Una visión general sobre el papel del glutatión y fitoquelatinas en metales pesados y la tolerancia al estrés de las plantas^[60]

Las plantas experimentan estrés oxidativo después de la exposición a los metales pesados que conduce a un daño celular. Además, las plantas acumulan iones metálicos que perturban la homeostasis iónica celular. Para reducir al mínimo los efectos perjudiciales de la exposición a metales pesados y su acumulación, las plantas han desarrollado mecanismos de detoxificación. Tales mecanismos se basan principalmente en la quelación y la compartimentación subcelular. La quelación de metales pesados es una estrategia de desintoxicación ubicua, que se describe en gran variedad de plantas. Una clase principal de quelante de metales pesados en las plantas es conocida fitoquelatinas (FQ_n), una familia de péptidos ricos en Cys. Las FQ_n se sintetizan de la mutación de glutatión reducido (GSH) en una reacción de transpeptidación catalizada por la enzima sintasa fitoquelatina (FQ_n). Por lo tanto, la disponibilidad de glutatión es muy esencial para la síntesis de FQ_n en las plantas, al menos, durante su exposición a metales pesados.

4.7. Mecanismo de respuesta de las plantas a la presencia de metales pesados

Las plantas desarrollan diferentes mecanismos frente compuestos tóxicos y metales pesados. Entre ellos destacan los mecanismos de exclusión, mineralización, reducción, solubilización, acumulación, quelación y translocación.^[48,61] Algunos son pasivos, como la adsorción por exclusión y otros son activos, es decir que requieren energía metabólica para llevarse a cabo, como la acumulación, translocalización o relocalización. La translocación es un tipo de alteración de un patrón de compartimentación del metal, es decir, algunas plantas translocan o transfieren el exceso del metal a las hojas viejas. Otras limitan el transporte de la raíz al tallo. La vacuola tiene un funcionamiento especial en el almacenamiento de metales. Los iones metálicos se transportan de manera activa al interior del **tonoplasto**⁷ como iones libres o como complejos metal-molécula quelante.^[63] La pared celular vincula la disminución de permeabilidad de la membrana celular, y en algunas ocasiones activa la extrucción. La absorción por orgánulos y vacuolas o comprobación con agentes quelantes tales como las proteínas, por ejemplo metalotioneína y fitoquelatinas ^[64,62] Los procesos de detoxificación que usualmente se conocen son la adsorción y bioacumulación.^[63,64] En años recientes, la habilidad de las plantas para acumular contaminantes ha recibido mayor atención. Hay informes que indican que algunas especies pueden acumular metales pesados específicos, por ejemplo *Spirodela polyrhiza* que acumula Zn.^[65] Además, se han encontrado algunas especies con la capacidad de acumular altas concentraciones de metales pesados en su biomasa las cuales son llamadas "Hiperacumuladoras".

La hiperacumulación combina aspectos de adsorción, transporte y translocación de metales. Se considera que existe hiperacumulación en las plantas, cuando la concentración del metal acumulado en los tejidos de la plantas se encuentra en el rango de 0,1-1 % del peso seco de la planta. Este porcentaje es particular para diferentes metales.^[65]

Hasta la fecha, han sido reportadas más de 430 especies como hiperacumuladoras de metales pesados. Desde hiervas anuales hasta arbustos perennes y árboles. Por ejemplo manglares como *Avicenia*, han sido reportados como hiperacumuladoras de cobre, plomo y zinc.^[66]

Las estrategias para evitar que los metales pesados aumenten en las plantas son diversas. Extracelularmente se incluyen las micorrizas, la pared celular y exudados extracelulares. La tolerancia puede además involucrar la membrana plasmática y el citosol. Dentro del protoplasto existe una variedad de mecanismos potenciales para la reparación de los daños de estrés de metales por ácidos orgánicos, aminoácidos o péptidos, o su compartimentalización a procesos metabólicos para el transporte dentro de la vacuola. Esta gama de mecanismos están resumidos en la figura 4.13.

⁷ El **tonoplasto** : Es la membrana que delimita la vacuola central en las células vegetales. Es selectivamente permeable y permite incorporar ciertos iones al interior de la vacuola. Es responsable de la turgencia celular y permite a las células de las plantas incorporar y almacenar agua con muy poco gasto de energía.

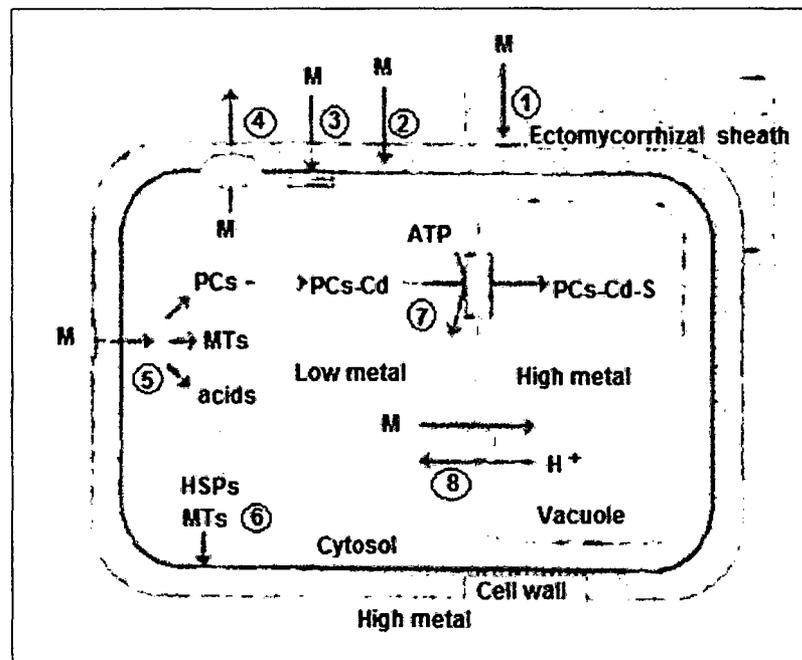


Figura 4.11: Resumen de los mecanismos potenciales celulares disponibles para la detoxificación y tolerancia de metales en plantas.^[105]

En la figura 4.13, se describen las etapas del mecanismo de detoxificación y tolerancia de metales en plantas.

1. Restricción del movimiento del metal a las raíces por micorrizas
2. Unión a la pared celular y exudados de las raíces
3. Entrada del flujo reducido frente a la membrana plasmática
4. Salida activa dentro del apoplasto
5. Quelación en citosol por varios ligandos
6. Reparación y protección de la membrana plasmática bajo condiciones de tensión
7. Transporte del complejo PC_s-Cd (Fitoquelatina-cadmio) dentro de la vacuola.

4.8. Hiperacumulación de metales pesados en plantas

Algunas plantas pueden acumular metales pesados dentro y fuera de sus tejidos, debido a su gran habilidad para adaptarse a las propiedades químicas del medio ambiente. Siendo así, pueden ser consideradas reservorios intermediarios a través de los cuales los metales pesados se mueven desde el suelo, al agua hasta llegar hasta los animales y el hombre.

Las plantas pueden ser receptores pasivos de metales pesados, aunque también pueden ejercer control sobre las traslocación o reinserción de algunos elementos a través de reacciones fisiológicas específicas. Las plantas pueden presentar diferentes mecanismos de tolerancia en respuesta al exceso de metales pesados, incluida la reducción del transporte a través de membrana, exclusión, formación de péptidos ricos en grupos tiólicos (fitoquelatinas y metalotioneínas) quelatación por ácidos orgánicos y aminoácidos, y compartimentación del metal en estructuras subcelulares.

La hiperacumulación de metales pesados por plantas superiores es un proceso complejo, desarrollado en varias etapas: a) bioactivación de metales pesados en la rizosfera, b) transporte de metales a través de la membrana plasmática de las células radiculares, c) traslocación de metales a través del xilema, d) detoxificación y secuestro metales por la planta.^[67]

En la figura 4.12, se muestra los mecanismos implicados en la hipertolerancia y la distribución de metales pesados en una planta excluidora, no hiperacumuladora (izquierda) y una hiperacumuladora (derecha). (1) la unión a las paredes de las células y/o exudados celulares de metales pesados, (2) la absorción de la raíz, (3) la quelación en el citosol y/o el secuestro de vacuolas, (4) translocación de la raíz al vástago. Los puntos indican el órgano de la planta en la que los diferentes mecanismos ocurren y los tamaños de los puntos el nivel de cada uno de ellos. De acuerdo con la hipótesis de defensa elemental, las concentraciones de metales pesados en las hojas hiperacumuladoras las hacen venenosas para los herbívoros.

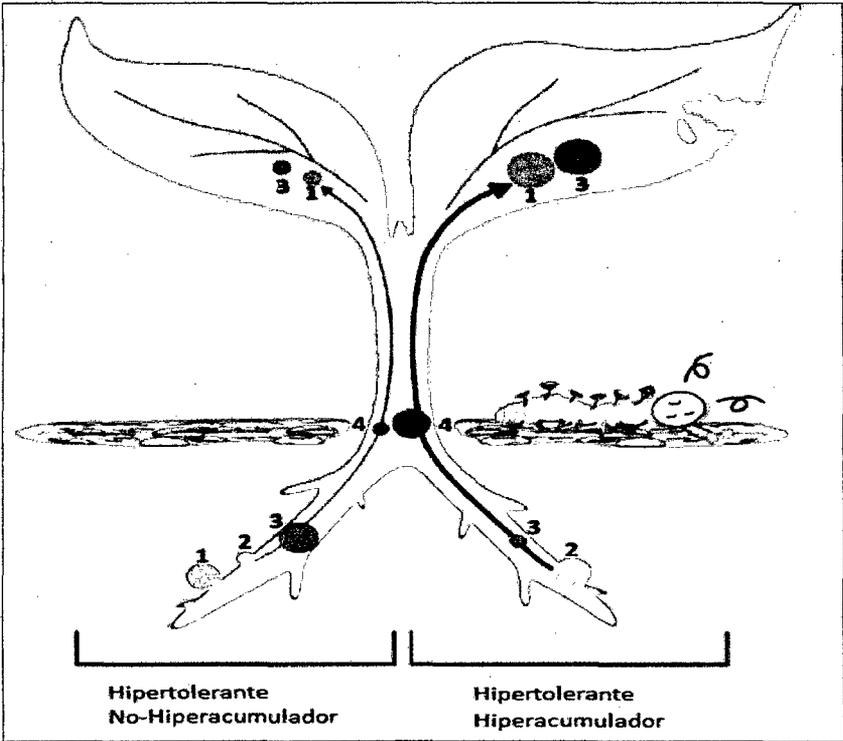


Figura 4.12: Mecanismos implicados en la hipertolerancia de metales pesados y la distribución de metales pesados en una planta no hiperacumuladora (izquierda) y una hiperacumuladora (derecha).^[67]

4.9. Compartimentación

Los iones metálicos en exceso son removidos del citosol, y el principal mecanismo desarrollado es la compartimentación. El principal compartimiento de almacén de metales pesados en células de plantas es la vacuola⁸, existen evidencias del secuestro vacuolar de iones metálicos en las plantas, lo que previene la circulación de metales pesados en el citosol y los transporta hacia un área limitada.^[68] Los transportadores potencialmente relacionados han sido identificados en *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe* y en plantas.^[69] En *S. pombe* encontraron el gen HTM1 que codifica la proteína HTM1, capaz de transportar eficazmente el complejo Cd-fitoquelatina hacia la vacuola. Una actividad similar de transporte fue detectada en el tonoplasto de células radicales de avena, indicando la operación de un HTM1 como mecanismo de transporte en células de plantas.^[70] Mientras tanto, ningún homólogo de HTM1 ha sido identificado en plantas.

Las fitoquelatinas son encontradas formando complejos con Cd, de bajo y alta masa molecular (LMW y HMW, respectivamente). Generalmente, se asume que los complejos LMW se forman en el citosol y luego son transportados a la vacuola cuando el Cd y S son incorporados para producir un complejo HMW que representa la principal forma de almacenamiento de Cd. En la vacuola, debido al pH ácido, los complejos de alta masa molecular se disocian y el Cd puede ser complejado por varios ácidos orgánicos vacuolares, como citrato, oxalato, malato^[71] posiblemente a través de aminoácidos.

Las fitoquelatinas pueden ser degradadas a través de hidrolasas vacuolares y/o regresar al citosol donde puedan continuar transportando el Cd para la vacuola. Ortiz, D.F. y colaboradores aislaron mesófilo de protoplasto de tabaco expuesto a Cd y demostraron que todo complejo Cd-PC formado fue transportado hacia la vacuola.^[68] Estos autores sugieren que los complejos Cd-PC son sintetizados extravacuolarmente y es por esto que serán encontrados en las vacuolas por lo que esta molécula debe estar relacionada en el transporte del Cd a la vacuola.

para la vacuola por transporte del ion.^[54] Una de las vías es la actividad antiporte $\text{Cd}^{2+} 2\text{H}^{+}$ detectada en el tonoplasto de células de raíz de avena.^[76]

La compartimentación de metales en vacuola también es parte de un mecanismo de tolerancia de algunas hiperacumuladoras de metales pesados.^[72] La planta hiperacumuladora de Ni, *Thlaspi goesingense*, aumenta la tolerancia al Ni compartimentando la mayor parte de este elemento de las hojas, en las vacuolas.^[73] Los altos niveles de expresión del transportador de metal TgMTP1 vacuola en *T. goesingense* fue relacionado con el cúmulo de iones metálicos dentro de vacuolas en las hojas.^[74] Por otra parte, existen evidencias de que el Cd puede ir directamente

⁸ **Vacuola:** Es un orgánulo celular presente en todas las células de plantas y hongos. También aparece en algunas células protistas y de otros eucariotas. Las vacuolas son compartimentos cerrados o limitados por membrana plasmática que contienen diferentes fluidos, como agua o enzimas, aunque en algunos casos puede contener sólidos. La mayoría de las vacuolas se forman por la fusión de múltiples vesículas membranosas. El orgánulo no posee una forma definida, su estructura varía según las necesidades de la célula en particular.

4.10. Aplicaciones de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)



Figura 4.13: Especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).

En lo que respecta a *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) es una de las especies más estudiadas, debido a sus características depuradoras y facilidad de proliferación. Esta planta obtiene del agua, todos los nutrientes que requiere para su metabolismo, siendo el nitrógeno y el fósforo, junto a los iones de potasio, calcio, magnesio, hierro, amonio nitrito, sulfato, cloro, fosfato y carbonato, los más importantes. Posee un sistema de raíces, que pueden tener microorganismos asociados a ella que favorece la acción depuradora de la planta. En general, estas plantas son capaces de retener en sus tejidos una gran variedad de metales pesados (como cadmio, mercurio y arsénico específicamente).

El mecanismo de cómo actúa se cree es a través de formaciones de complejos entre el metal pesado con los aminoácidos presentes dentro de la célula, previa absorción de estos metales a través de las raíces.

Cuadro 4.1: Plantas capaces de acumular cuatro a mas metales.^[76]

Nombre científico plantas acuáticas	Nombre común	Número de elementos	Elementos
<i>Azolla filiculoides</i>	Helecho acuático	4	Cu ,Ni, Mn, Pb
<i>Monieri bacopa</i>	Bacopa	5	Cd, Cu, Cr, Hg, Pb
<i>Eichornia crassipes</i>	Jacinto de agua	6	Cd, Cu, Cr, Hg, Pb, Zn
<i>Hyrilla verticillata</i>	Maleza acuática	4	Cd, Cr, Hg, Pb
<i>Lemna minor L</i>	Lenteja de agua	4	Cd, Pb, Zn, Cu
<i>Pistia stratiotes</i>	Lechua de agua	4	Cd, Cu, Cr, Hg
<i>Salvinia molesta</i>	Salvinia	4	Cr, Pb, Zn, Ni
<i>Spirodela polyrrhiza</i>	Flores de agua	5	Cd, Cr, Pb, Zn, Ni
<i>Vallisneria americana</i>	Valisneria lisa	4	Cd, Cu, Cr, Pb

4.11. Composición química de nutrientes para la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)^[77]

La composición química del nutriente se muestra en el cuadro 4.2.

Cuadro 4.2: Composición química de nutrientes

Tipos de solución	Composición química	Cantidad de cada compuesto
Solución concentrada A	Nitrato de potasio (KNO ₃)	110 g
	Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	70 g
	Superfosfato triple [Ca(H ₂ PO ₄) ₂]	36 g
Solución concentrada B	Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	110 g
	Quelato de hierro (Fe-o,o-EDDHA)	8,5 g
	Solución de micronutriente	200 mL
Solución de micronutrientes	Sulfato de manganeso (MnSO ₄ .4H ₂ O)	5,0 g
	Acido bórico (H ₃ BO ₃)	3,0 g
	Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	1,7 g
	Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	1,0 g
	Molibdato de amonio ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄)	0,2 g

CAPÍTULO V

PARTE EXPERIMENTAL

5 PARTE EXPERIMENTAL

El siguiente acápite pone en consideración los equipos, materiales, reactivos y métodos que fueron utilizados de forma específica durante el desarrollo del proyecto de investigación y además se detallan los procedimientos técnicos para alcanzar los objetivos planteados.

5.1. Materiales, equipos y reactivos.

En los cuadros 5.1 y 5.2, se detallan los materiales, equipos y reactivos empleados en las diferentes etapas (campo, laboratorio y oficina) de la investigación.

Cuadro 5.1: Detalle de materiales de campo, muestreo y siembra

Materiales de campo	Materiales de muestreo	Material de siembra
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Libreta de campo. ✓ Guantes quirúrgicos desechables ✓ Botas de caucho ✓ Recipiente de transporte de especies vegetales 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Papel pH (pampea). ✓ Etiquetas ✓ Botella de 1 L de plástico 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>Eichhornia crassipes</i>

Cuadro 5.2: Detalle de equipos de campo, oficina y laboratorio

Equipos de campo y oficina	Equipos de laboratorio
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cámara digital. ✓ Computadoras ✓ Unidad de almacenamiento masivo(USB) ✓ Calculadoras ✓ Cronómetros 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Espectrofotómetro VARIAN modelo SPECTRA 240F ✓ Medidores de Conductividad Thermo Scientific Orion 3-Star Plus ✓ Medidores de pH Thermo Scientific Orion 3-Star Plus ✓ Oxímetro de mesa para laboratorio Hi 2400 Hanna ✓ Espectrofotómetro HACH Modelo DR/2400

Cuadro 5.3: Reactivos usados en el laboratorio durante la investigación

Reactivos	Cantidad
Patrón de 1000 ppm de cadmio-Merck	50 mL
Patrón de 1000 ppm de mercurio-Merck	50 mL
Acido nítrico (HNO ₃) concentrado Mallinckrodt	500 mL
Acido clorhídrico(HCl) concentrado Tedia	50 mL
Peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂) 30 % Merck	500 mL
Acido sulfúrico (H ₂ SO ₄) concentrado Mallinckrodt	300 mL
Permanganato de potasio (KMnO ₄) Merck	50 g
Peroxodisulfato (K ₂ S ₂ O ₈) Merck	25 g
Cloruro de estaño (SnCl ₂) Merck	100 g
Clorhidrato de Hidroxilamina (HCl.NH ₂ OH) Merck	100 g
Agua ultrapura (H ₂ O)	10 L

5.2. Muestreo de la especie vegetal *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

La especie vegetal Jacinto de agua fue colectada en el valle chillón en el distrito de Carabayllo, provincia y departamento de Lima, el 20 de setiembre del 2012. En este lugar crecen en humedales, estanques y piscinas. Luego del muestreo, estas plantas se llevaron a una piscina hecha de ladrillo y cemento de dimensiones 1,80 m (largo), 1,20 m (ancho) y 20 cm (alto), construida exclusivamente para el almacenamiento y cultivo de estas plantas, las mismas que se llevarían al laboratorio para realizar los ensayos correspondientes.

En la figura 5.1, se observa el muestreo del Jacinto de agua y la colocación de las plantas en la piscina que contiene una solución con nutrientes, los mismos que serán usados en el laboratorio para optimizar la concentración de los mismos.



Figura 5.1: Izquierda (Recolección de Jacinto de agua), derecha (Colocación del Jacinto de agua en la piscina de cultivo).



Figura 5.2: Muestreo del agua donde crece *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).

5.3. Parámetros fisicoquímicos del agua de muestreo

En la figura 5.2 se aprecia el muestreo de las aguas en el punto de muestreo donde crece *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).

Los parámetros fisicoquímicos analizados en las aguas del punto de muestreo se presentan en el cuadro 5.3. También se analizaron los metales presentes en dichas aguas por ICP-OES y absorción atómica tal como lo muestra el cuadro 5.4.

Como se puede apreciar en la figura 5.2, se muestreó el agua superficial en diferentes puntos del estanque, a partir de estas, se hizo un compósito y se analizaron durante las primeras 24 horas, los parámetros de campo como el pH, conductividad, oxígeno disuelto, DBO, turbidez y detergentes. Para los parámetros aceites y grasas, fósforo total, nitritos-nitratos, DQO y dureza total se tomaron 2 litros de muestra y se preservó con 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1:1. Para determinar los metales se tomó una alícuota de 250 mL y se preservó con 1 mL de ácido nítrico (HNO_3) 1:1 y se analizaron los parámetros mostrados en los cuadros 5.3 y 5.4 .

Cuadro 5.4: Ensayos fisicoquímicos realizados a la muestra de agua donde crecía *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)^[78]

Parámetro	Unidades	Resultado	Técnicas analíticas	Método
Conductividad	µS/cm	985	Conductancia	APHA 2510-B L.D = 0.01
pH	pH	7,54	Electrométrico	APHA 4500-H ⁺ -B L.D =2 µS/cm
Oxígeno disuelto	mg/L	5,79	Metodo yodométrico (Winkler)	APHA 4500-O-C D L. =0.1 mg/L
Turbidez	NTU	12,7	Turbidimetría	APHA 4500-H+-B L.D =1 NTU
Demanda bioquímica de oxígeno	mg/L	7,53	Electrométrico	APHA 5210-B L.D =2 mgO ₂ /L
Demanda química de oxígeno	mg/L	15,06	Colorimétrico	APHA 5220-D L.D =10 mgO ₂ /L
Alcalinidad	mg/L	186,6	Potenciometría	APHA 2320-B L.D =1 mg/L
Acidez	mg/L	15,95	Potenciometría	APHA 2310-B L.D =1 mg/L
Sólidos totales disueltos	mg/L	541,75	Gravimétrica	APHA 2540-C L.D =10 mg/L
Nitritos	mg/L	0,1	Colorimétrico	APHA 4500-NO ₂ ⁻ -B L.D =0.01 mg/L
Nitratos	mg/L	1,97	Colorimétrico	APHA 4500-NO ₃ ⁻ -E L.D =0.005 mg/L
Fosfatos	mg/L	6,4382	Colorimétrico	APHA 4500-P-F L.D =0.001 mg/L
Fosforo total	mg/L	2,1009	Colorimétrico	APHA 4500-P-E L.D =0.01 mg/L
Aceites y grasas	mg/L	0,2	Gravimétrico	APHA 5520-B L.D =1 mg/L
Detergentes (surfactantes aniónicos)	mg/L	0,0506	Espectrofotométrico	APHA 5540-C L.D =0.01 mg/L
Dureza total	mg/L	819,74	Volumetrica	APHA 2340-C L.D =0.5 mg/L
Fluoruros	mg/L	0,33	Electrométrico	APHA 4500-F-C L.D =0.02 mg/L
Cloruros	mg/L	35,95	Electrométrico	APHA 4500-Cl-C L.D =0.02 mg/L
Bromuros	mg/L	0	Cromatográfico	APHA 4500-Br-C L.D =0.02 mg/L
Sulfatos	mg/L	277	Gravimétrico	APHA 4500-SO ₄ ²⁻ -E L.D =1 mg/L

Cuadro 5.5: Resultados de metales encontrados en aguas del punto de muestreo del Jacinto de agua, determinados por ICP-MS y absorcion atomica.

Elemento	Formula	Peso atómico (uma)	Limite de deteccion (mg/L)	Concentracion (mg/L)
Aluminio	Al	27	0,001	0,43
Amtimonio	Sb	121	0,00005	0
Arsenico	As	75	0,0001	0,02
Azufre	S	32	0,5	90,37
Bario	Ba	138	0,00005	0,06
Berilio	Be	9	0,0005	<0,0005
Bismuto	Bi	209	0,0005	<0,0005
Boro	B	11	0,001	0,43
Cadmio	Cd	111	0,00002	0
Calcio	Ca	43	0,01	122,67
Cromo	Cr	52	0,0002	0
Cobalto	Co	59	0,0001	0
Cobre	Cu	63	0,0001	0,01
Estroncio	Sr	88	0,0001	1,54
Estaño	Sn	118	0,0001	0
Fósforo	P	31	0,1	1,43
Hierro	Fe	57	0,03	0,44
Litio	Li	7	0,001	0,05
Magnesio	Mg	24	0,005	23,36
Manganeso	Mn	55	0,00005	0,37
Mercurio	Hg	200	0,00005	<0,00005
Molibdeno	Mo	95	0,00005	0,01
Niquel	Ni	60	0,0002	0
Potasio	K	39	0,01	10,78
Plata	Ag	107	0,00001	<0,00001
Plomo	Pb	208	0,00005	0,01
Selenio	Se	82	0,001	<0,001
Silice	Si	29	0,05	8,64
Sodio	Na	23	0,01	30,1
Talio	Tl	205	0,00005	<0,00005
Titanio	Ti	49	0,005	0,02
Uranio	U	238	0,00001	0
Vanadio	V1	51	0,001	0
Zinc	Zn	66	0,001	0,12

5.4. Métodos estandarizados utilizados

Los métodos estandarizados usados para el tratamiento y determinación de cadmio y mercurio en las muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) y en las soluciones residuales fueron los siguientes.

5.4.1 Método digestión de metales (APHA 3030-d, 21st ed. 2005).

Este método se describe en el anexo N° 1

5.4.2 Método para digestión por ácido nítrico (APHA 3030-e, 21st ed. 2005).

Este método se detalla en el anexo N° 1. A continuación presentamos el diagrama de flujo del método.

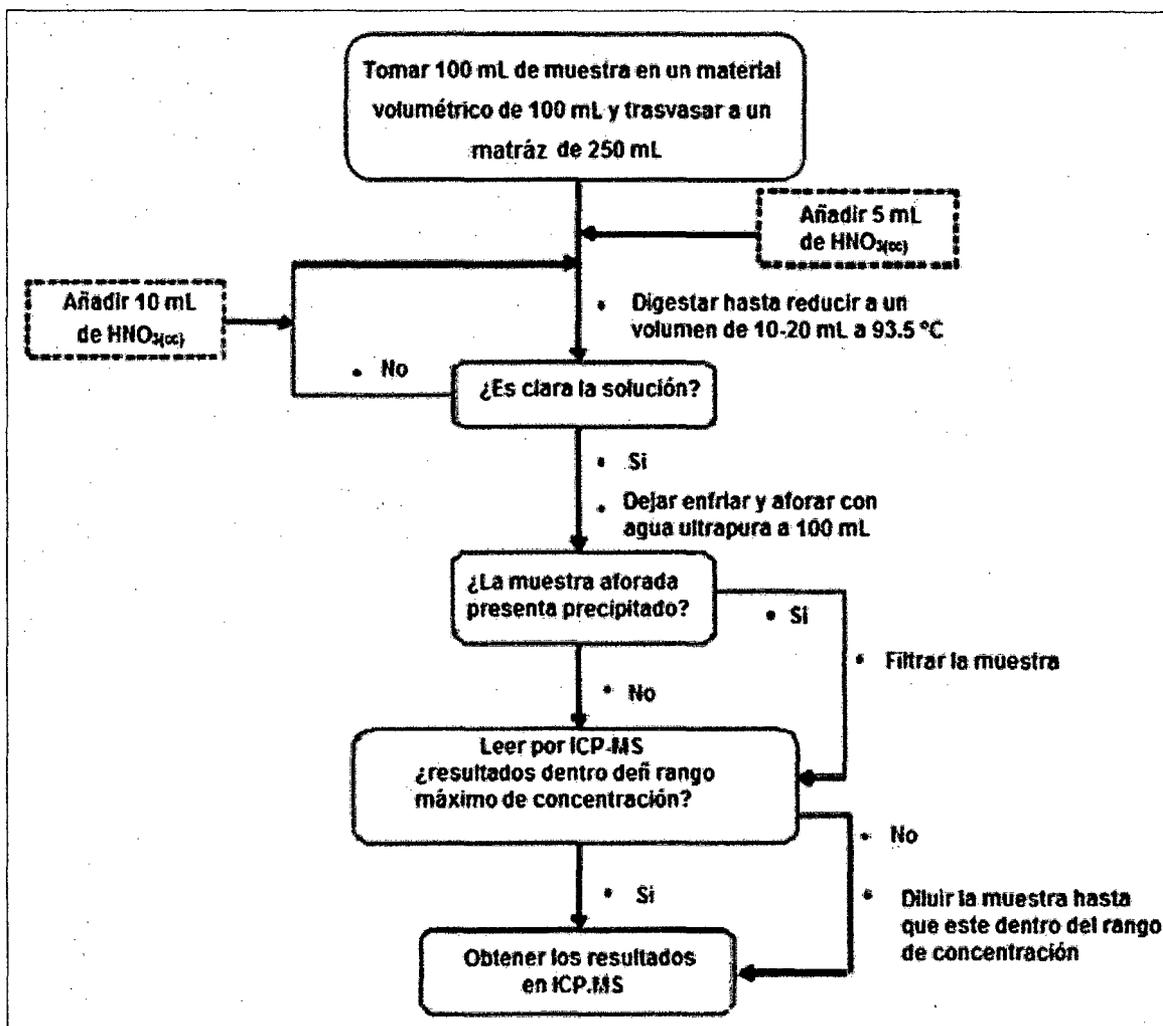


Figura 5.3: Diagrama de flujo para digestión de metales y lectura por ICP-OES, ICP-MS y absorción atómica. (APHA 3030-e, 21st ed. 2005).

5.4.3 Método EPA 200.3: Digestión de metales en tejido por ICPOES/ICPOMS y absorción atómica

En el siguiente diagrama se resume el método EPA 200.3 descrito en el anexo 1, para la digestión de tejidos vegetal o animal.

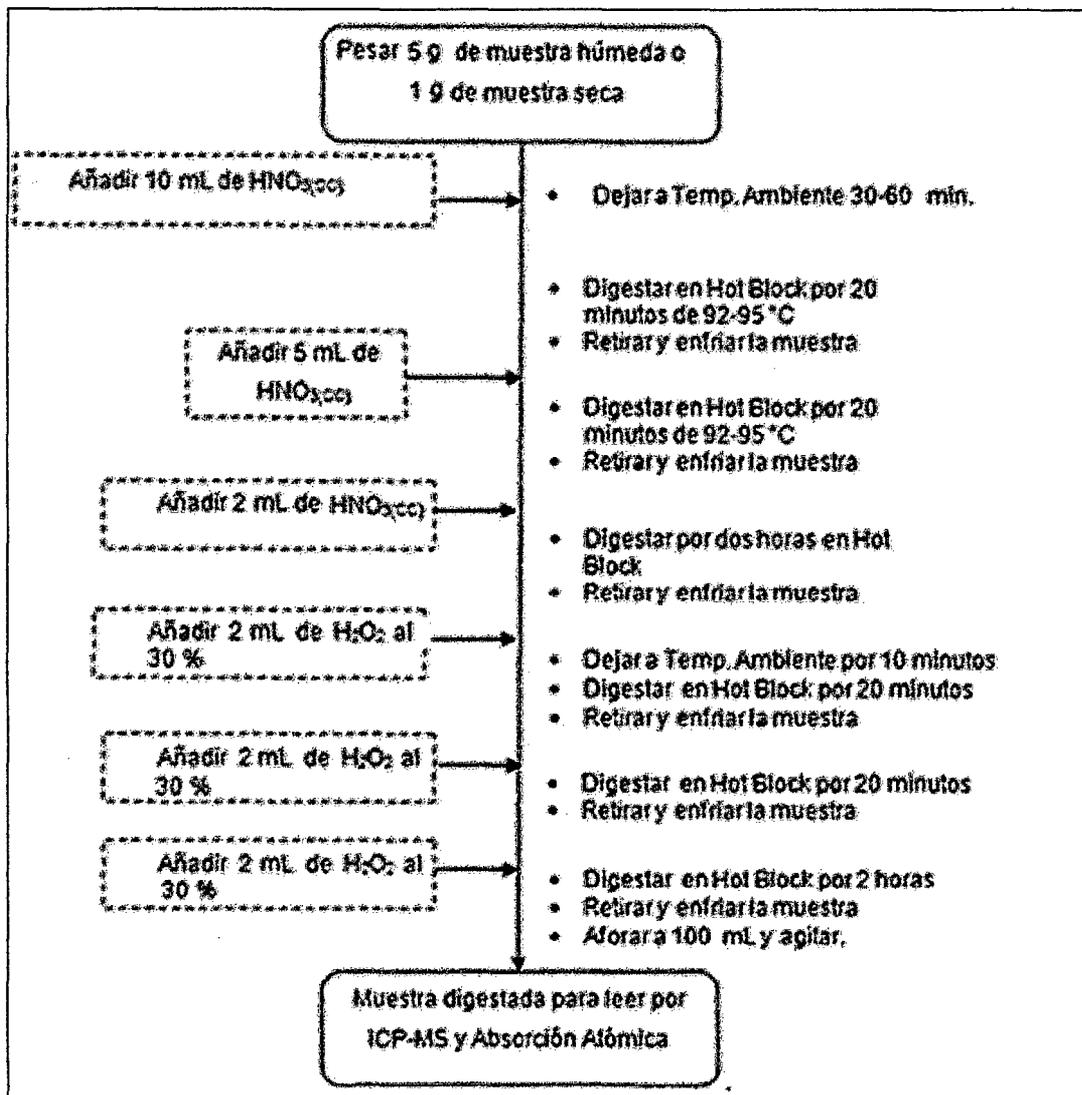


Figura 5.4: Diagrama de flujo para la digestión de tejidos por ICP-OES-MS (método EPA 200.3).

Método espectrométrico de absorción atómica de vapor frío (APHA 3112-b, 21st ed. 2005).

En el siguiente diagrama se resume el método APHA 3112.b, 21 st ed. 2005 descrito en el anexo 1, que sirve para la determinación de mercurio.

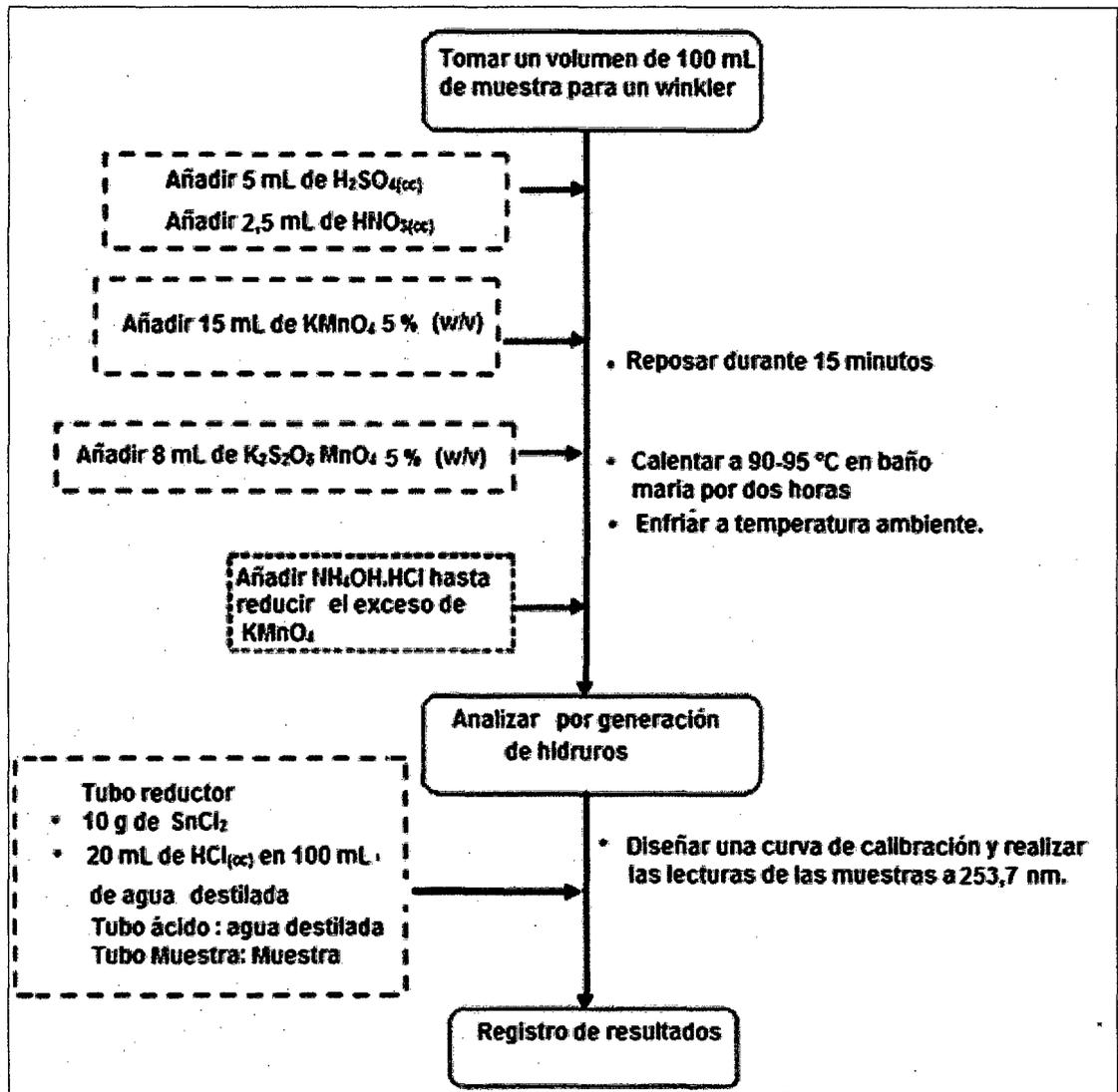


Figura 5.5 :Diagrama de flujo para determinación de mercurio por generación de hidruros (APHA 3112-b, 21st ed. 2005).

5.5. Preparación de los nutrientes para la optimización

Para determinar la dosis óptima de nutriente se prepararon tres soluciones; una solución A, solución B y una solución de micronutrientes cuya composición se muestra en el cuadro 5.6 :

Cuadro 5.6: Composición de de las soluciones concentradas de nutrientes.

Tipos de solución	Composición química	Cantidad de cada compuesto	Volumen final (L)
Solución concentrada A	Nitrato de potasio (KNO ₃)	110 g	5
	Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	70 g	
	Superfosfato triple (Ca(H ₂ PO ₄) ₂)	36 g	
Solución concentrada B	Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	110 g	1
	Quelato de hierro (Fe-o,o-EDDHA)	8,5 g	
	Solución de micronutriente	200 mL	
Solución de micronutrientes	Sulfato de manganeso (MnSO ₄ .4H ₂ O)	5,0 g	1
	Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	3,0 g	
	Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	1,7 g	
	Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	1,0 g	
	Molibdato de amonio ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄)	0,2 g	

5.5.1 Preparación de la solución concentrada "A"

- ✓ Se remojó por 24 horas el superfosfato triple en aproximadamente 50 mL de agua.
- ✓ Se disolvió por completo el superfosfato agregando agua adicionalmente. Se eliminó el residuo final que son impurezas del químico.
- ✓ En otro recipiente, se agregó 200 mL de agua y el nitrato de potasio. Agitándose hasta que se diluyó.
- ✓ Se mezclaron las soluciones de superfosfato y nitrato de potasio con cuidado de no pasar el nitrato de potasio no disuelto.
- ✓ Se agregó 500 mL de agua sobre el nitrato de potasio no disuelto y se agitó. Luego se mezcló la solución con el superfosfato triple. Repitiendo esta operación hasta disolver todo el nitrato de potasio y luego se vertió sobre la solución de superfosfato triple. En otro recipiente, se agregó 100 mL de agua y el nitrato de amonio, agitando hasta que se diluyó todo el compuesto.
- ✓ Se mezclaron todas las soluciones de superfosfato triple, nitrato de potasio y nitrato de amonio.
- ✓ Se agregó agua a la solución final hasta completar un volumen de 1 litro de solución que llamaremos solución A.
- ✓ Finalmente se almacenó la solución concentrada A en un recipiente de vidrio oscuro de 1L en un lugar seco y fresco.

5.5.2 Preparación de la solución concentrada "B"

- ✓ En un litro de agua se agregó el sulfato de magnesio y se agitó hasta que los cristales se disolvieron.
- ✓ Se agregó 200 mL de la solución de micronutrientes y se agitó (ver preparación).
- ✓ Se agregó el quelato de hierro y se agitó hasta disolver completamente.
- ✓ Se agregó agua hasta completar un volumen de 1 litro de solución a la que llamaremos solución concentrada B.
- ✓ Finalmente se almacenó la solución concentrada B en un recipiente de vidrio oscuro en un lugar seco y fresco.

5.5.3 Preparación de la solución concentrada de micronutrientes

- ✓ Se disolvió en 200 mL de agua cada unas de las sales en el orden que aparece en la tabla de composición de la solución de micronutrientes.
- ✓ Se agregó agua hasta completar 1 litro de solución.
- ✓ Finalmente se almacenó la solución de micronutrientes en un recipiente de vidrio oscuro en un lugar seco y fresco.

5.6. Determinación de la dosis óptima de nutrientes para *Eichhornia crassipes*

Para determinar la dosis óptima de nutrientes se prepararon diferentes mezclas de la solución A y solución B mostrados en el cuadro 5.7 en un volumen de 1 litro, en las cuales se sometieron muestras de un tamaño y peso promedio y se midió el tiempo de supervivencia de cada planta a diferentes concentraciones de las soluciones A y B.

Cuadro 5.7: Dosis de la solución A y B para diferentes muestras (plantas)

Muestra N°	Solución "A" (mL)	Solución "B" (mL)	pH solución
1	0,5	0,5	5,05
2	1	0,5	5,25
3	1	1	5,17
4	1,5	1	5,25
5	2	1	5,20
6	2	2	5,10
7	2,5	1	5,02
8	2,5	2	5,27
9	5	2	5,4
10	5	2,5	5,00
11	5	5	4,95
12	10	5	5,09

Luego de ser sometidas cada muestra con las diferentes dosis de nutrientes se realizó un seguimiento de cada muestra en función de tiempo (días) y se observaron cualitativamente todas las partes de la planta anotando cualquier diferencia con el aspecto que presenta al inicio. Para ello se tomaron algunas fotos que describen la observación realizada a dos muestras similares de diferentes dosis como se aprecia en la figura 5.6.



Figura 5.6: Izquierda; Se muestra *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) con una dosis de 1 mL de A y 1 mL de B (muestra 3) y Derecha; se muestra *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) con una dosis de 5 mL de A y 5 mL de B (muestra 11) en el primer día.

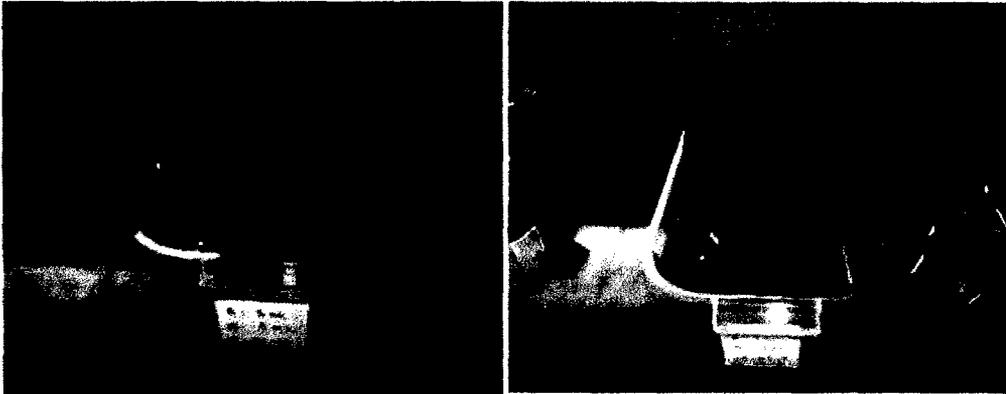


Figura 5.7: Izquierda; se muestra *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) con la dosis de 1 mL de A y 1 mL de B (muestra 3) y Derecha; se muestra *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) con una dosis de 5 mL de A y 5 mL de B (muestra 11) después de 15 días.

Las 12 muestras sometidas a diferentes concentraciones (cuadro 5.7) se fueron secando con el paso de los días, por ejemplo en la figura 5.6 y 5.7, se observan las muestras 3 y 11 (plantas) en el primer día y después de 15 días, apreciándose claramente algunas hojas secas, tallos marchitos y el fraccionamiento de las raíces que nos indica que la planta esta muriendo por la falta de nutrientes en el primer caso y un exceso de nutrientes en el segundo, lo que provoca que la planta se sature y comience a secarse.

De todas las muestras sometidas a diferentes concentraciones se obtuvo la dosis óptima que garantiza el crecimiento de la planta y un mayor tiempo de vida.

5.7. Efecto del pH sobre la viabilidad de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) y la solubilidad del metal

Para observar el efecto que ocasiona la variación de pH en el *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) se prepararon diferentes soluciones con la concentración conocida de nutriente ya optimizado, variando el rango de pH desde 1,5 a 8 y a cada solución se le adicionó 1 ppm de cadmio (II) y 1 ppm de mercurio (II), esto con la finalidad de determinar la solubilidad del ion metálico con respecto al pH de cada solución tal como lo muestra el cuadro 5.8.

Cuadro 5.8: Muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) para la optimización del pH y la solubilidad de cadmio (II) y mercurio (II)

Identificación de soluciones	Concentración de cadmio (II) (ppm)	Concentración de mercurio (II) (ppm)	pH de solución
1	1	1	1,5
2	1	1	2
3	1	1	3
4	1	1	4
5	1	1	5
6	1	1	6
7	1	1	7
8	1	1	8

En la figura 5.8, se aprecia el efecto del pH y la solubilidad del metal sobre dos plantas de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), una de ellas conteniendo 1 ppm de mercurio (II) y la otra muestra, 1 ppm de cadmio (II) a pH 1,5 y 2 respectivamente

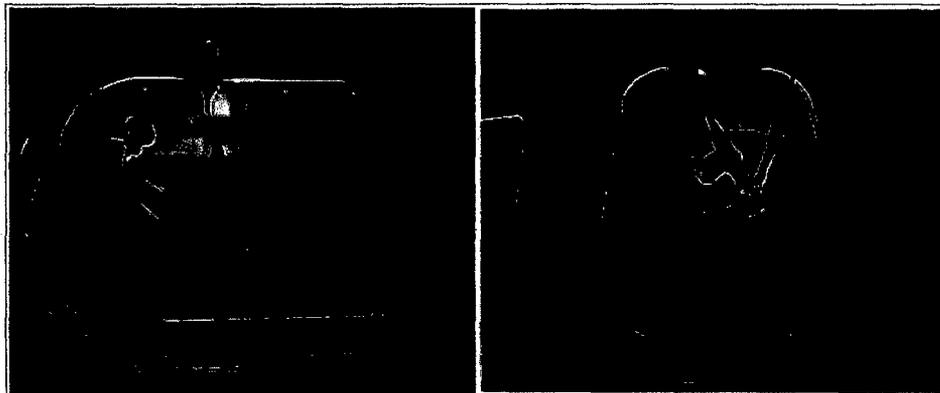


Figura 5.8: Izquierda; *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) sometida a una solución de 1 ppm de mercurio (II) a pH=1,5 después de 9 días , derecha; cadmio (II) a un pH=2 después de 9 días.

En la figura 5.9, se muestra el efecto del pH con la solubilidad del mercurio (II), donde se aprecia una ligera precipitación de un derivado del metal y los nutrientes presentes en la solución.

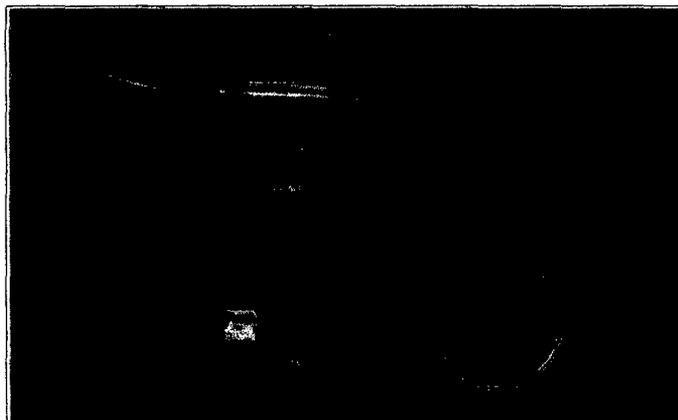


Figura 5.9: Se muestra *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) a pH=8 a una concentración de 1 ppm de mercurio (II) después de 9 días.

5.8. Determinación de la concentración óptima de los metales para la viabilidad de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Con la finalidad de determinar la concentración óptima de metales cadmio (II) y mercurio (II) a la cual la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) será sometido y soportará el mayor tiempo de vida y nos permitirá llegar a cumplir nuestros objetivos. Para ello se prepararon diferentes soluciones de un litro para cadmio (II) y mercurio (II), a una determinada concentración de nutrientes y pH ya conocidas. Variando la concentración de cadmio (II), desde 1 a 20 ppm y el mercurio (II) desde 1 a 25 ppm en diferentes muestras que se muestran en el cuadro 5.9. Las muestras de Jacinto de agua se sometieron simultáneamente a cada solución con una determinada concentración conocida de cada metal. Para cada caso se anotaron todas las observaciones desde el primer día en adelante, con la finalidad de encontrar la concentración óptima para la máxima supervivencia de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).

Cuadro 5.9: Número de muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) sometidas a una determinada concentración de cadmio (II) y mercurio (II)

Metal en estudio	Numero de muestras de Jacinto de agua	Concentración del ion metálicos (ppm)
Cadmio (II)	1	1
	1	5
	1	10
	1	15
	1	20
Mercurio (II)	1	1
	1	5
	1	10
	1	15
	1	20
	1	25

En la figura 5.10, se muestra el efecto de la toxicidad de una solución de 20 ppm de cadmio (II) frente a *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), luego de 8 días. Análogamente, en la figura 5.11 se muestra el efecto que causa el mercurio (II) con otra muestra de Jacinto de agua.

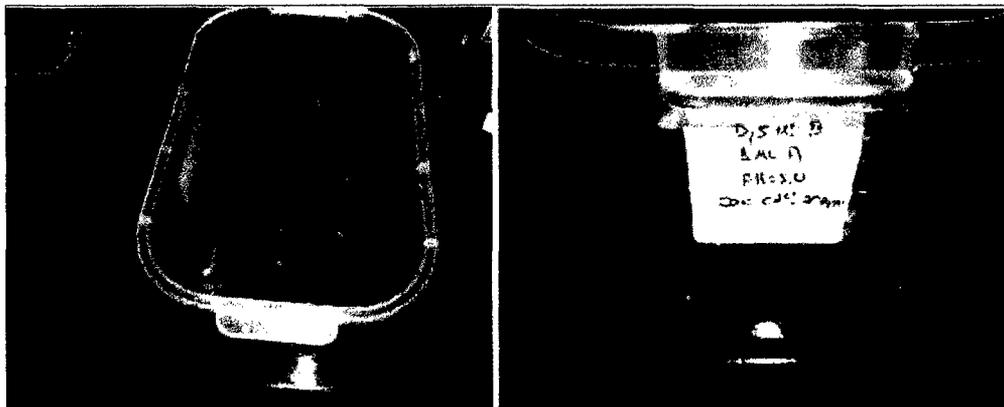


Figura 5.10: Izquierda (solución de 20 ppm de cadmio (II) frente al Jacinto de agua después de 8 días). Derecha (Vista lateral que muestra la etiqueta rotulada con los datos de la muestra).

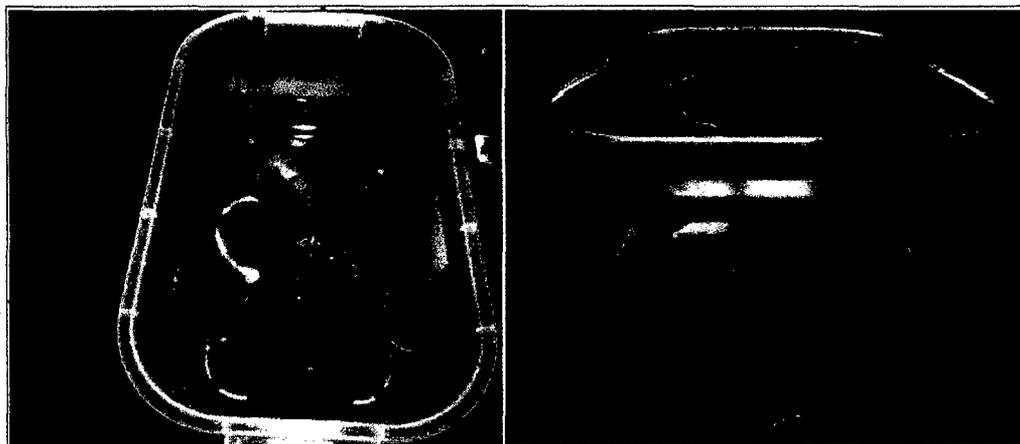


Figura 5.11: Izquierda (solución de 25 ppm de mercurio (II) frente al Jacinto de agua después de 8 días). Derecha (Vista lateral que muestra la etiqueta rotulada con los datos de la muestra).

5.9. Determinación de la concentración de cadmio (II) y mercurio (II) presentes en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Para determinar las concentraciones en ppm de cadmio (II) y mercurio (II) se sometieron ocho muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) previamente pesadas, en ocho recipientes de plástico conteniendo cada una un litro de solución con los parámetros de concentración de nutrientes, pH y concentración del metal ya optimizado. Las muestras sometidas fueron recolectadas cada 24 horas hasta el día ocho, simultáneamente se tomaron alícuotas de 50 mL en digitubos del mismo volumen, los cuales fueron preservados con 1mL HNO₃ 1:1, etiquetados y finalmente guardados para ser digeridos con HNO₃ concentrado.

5.9.1 Determinación de cadmio (II) y mercurio (II) en la misma planta

Para este ensayo, análogamente a la determinación de ambos metales juntos, se sometieron 8 muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) en soluciones con los parámetros necesarios ya optimizados. La recolección se dió cada 24 horas donde se colocaron las muestras en bolsas ziploc y se identificaron como se muestra en el cuadro 5.10, para luego ser digeridas según los métodos establecidos.

Cuadro 5.10 : Identificación y pesos de las muestras (plantas) recolectadas

Identificación de las muestras P=Plantas	Tiempo de recolección (Horas)	Peso de cada planta (g)	Peso húmedo de muestras (g)
M-1-D(P)	24	27,65	5,0020
M-2-D(P)	48	27,04	5,0050
M-3-D(P)	72	27,49	5,0020
M-4-D(P)	96	26,15	5,0030
M-5-D(P)	120	27,60	5,0060
M-5-D-Dup(P)	120	27,55	5,0011
M-6-D(P)	144	27,75	5,0021
M-7-D(P)	168	26,12	5,0040
M-8-D(P)	192	26,62	5,0015
BK	192	28,51	5,0010

5.9.2 Determinación de cadmio (II) en la misma planta

Para determinar la concentración de cadmio (II) en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), se procedió de la misma manera en la que se determinó con ambos metales juntos, en un litro de solución y a las mismas condiciones optimizadas; es decir concentración de nutrientes, pH y concentración de cadmio (II), cada una de las ocho muestras previamente pesadas e identificadas fueron sometidas de manera simultánea a cada recipiente. En el cuadro 5.11, se muestran los pesos de cada muestra (planta) con su respectiva identificación y el peso de muestra que se tomó para el análisis cada 24 horas hasta el día ocho. La muestra del octavo día se analizó con su duplicado, siempre acompañado de una muestra de Jacinto de agua como blanco.

Cuadro 5.11: Identificación y pesos de las muestras recolectadas para cada tiempo

Identificación de las muestras p=planta	Tiempo de recolección (horas)	Peso de cada planta (g)	Peso húmedo de muestras (g)
M-1-D-Cd(P)	24	55,25	4,9990
M-2-D-Cd (P)	48	55,23	4,9960
M-3-D-Cd (P)	72	53,63	4,9900
M-4-D-Cd (P)	96	56,32	4,9980
M-5-D-Cd (P)	120	56,45	4,9750
M-6-D-Cd(P)	120	55,51	5,0050
M-7-D-Cd (P)	144	56,7	5,0040
M-8-D-Cd (P)	168	55,49	5,0010
M-8-D-Dup-Cd (P)	192	55,45	5,0015
BK	192	51,88	5,0366

5.9.3 Determinación de mercurio (II) en la misma planta

Para determinar la concentración de mercurio en *Eichhornia crassipes*, se procedió de la misma manera en la que se determinó con ambos metales juntos, con un volumen de litro de solución y a las mismas condiciones optimizadas; es decir concentración de nutrientes, pH y concentración de mercurio (II). Cada una de las ocho muestras previamente pesadas e identificadas fueron sometidas de manera simultánea en cada recipiente. En el cuadro 5.12 se muestran los pesos de cada muestra de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) con su respectiva identificación y la muestra que se tomó para el análisis cada 24 horas hasta el día ocho. La muestra 8 se analizó por duplicado y se tomó una muestra *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) como blanco.

Cuadro 5.12: Identificación y pesos de las muestras recolectadas para cada tiempo

Identificación de las muestras p=planta	Tiempo de recolección (horas)	Peso de cada planta (g)	Peso húmedo de muestras (g)
M-1-D-Hg(P)	24	56,44	5,0010
M-2-D- Hg(P)	48	56,34	5,0260
M-3-D- Hg(P)	72	57,75	5,0270
M-4-D- Hg(P)	96	52,95	5,0030
M-5-D- Hg(P)	120	54,70	5,0030
M-6-D- Hg(P)	120	55,30	5,0140
M-7-D- Hg(P)	144	55,17	5,0010
M-8-D- Hg(P)	168	55,58	5,0020
M-8-D-Dup-Hg(P)	192	55,60	5,0024
BK	192	58,42	5,0770

5.10. Determinación de cadmio (II) y mercurio (II) en las soluciones residuales tratadas con *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Para determinar las concentraciones en ppm de cadmio (II) y mercurio (II) en las soluciones residuales se sometieron las muestras correspondientes al cuadro 5.10 de las cuales eran conocidas las dosis contenidas de nutrientes, el pH y la concentración de partida de cadmio (II) y mercurio (II). Las muestras sometidas fueron recolectadas cada 24 horas hasta el día ocho, simultáneamente se tomaron alícuotas de 50 mL de solución en digitubos del mismo volumen, los cuales fueron preservados con 1mL HNO₃ 1:1 y etiquetados como se muestra en el cuadro 5.13. Finalmente digeridos con HNO₃ concentrado según el método APHA 3030-e descrito en el anexo 1. Para todas estas muestras se escogió a la muestra 5 por duplicado y un blanco reactivo como control.

La muestra 5 es representativa porque representa un rango intermedio del tiempo de contacto con la planta (Jacinto de agua).

Cuadro 5.13 :Identificación de las muestras recolectadas para cada tiempo.

Identificación de las muestras SR=solución residual	Tiempo de recolección (horas)	Volumen de muestra (mL)	Preservante HNO ₃ 1:1 (mL)
M-1-D(SR)	24	50	1
M-2-D(SR)	48	50	1
M-3-D(SR)	72	50	1
M-4-D(SR)	96	50	1
M-5-D(SR)	120	50	1
M-5-D-DUP(SR)	120	50	1
M-6-D(SR)	144	50	1
M-7-D(SR)	168	50	1
M-8-D(SR)	192	50	1
BK	192	50	1

5.10.1 Determinación de cadmio (II) en la solución residual de *Eichhornia crassipes*

Para determinar el cadmio (II) en la solución residual luego de remover cada una de las ocho muestras de Jacinto de agua que se muestran en el cuadro 5.11, se tomaron alícuotas de 50 mL en digitubos y se preservaron con HNO₃ 1:1 cada una de ellas, luego se etiquetaron a cada digitubo como se muestra en el cuadro 5.14 y finalmente digeridos con ácido nítrico concentrado (HNO₃) según el método APHA 3030-e descrito en el anexo 1. Para todas estas muestras se escogió a la muestra 8 por duplicado y un blanco reactivo como control, luego se procedió a analizar las muestras con el equipo ICP-OES.

Cuadro 5.14: Identificación de las soluciones residuales de cadmio (II) recolectadas para cada tiempo

Identificación de las muestras SR=Solución residual	Tiempo de recolección (horas)	Volumen de muestra (mL)	Preservante HNO ₃ 1:1 (mL)
M-1-D-Cd(SR)	24	50	1
M-2-D-Cd(SR)	48	50	1
M-3-D-Cd(SR)	72	50	1
M-4-D-Cd(SR)	96	50	1
M-5-D-Cd(SR)	120	50	1
M-6-D-Cd(SR)	120	50	1
M-7-D-Cd(SR)	144	50	1
M-8-D-Cd(SR)	168	50	1
M-8-D-Dup-Cd (SR)	192	50	1
BK	192	50	1

5.10.2 Determinación de mercurio (II) en la solución residual de *Eichhornia crassipes*

Para determinar el mercurio (II) en la solución residual luego de remover cada una de las ocho muestras de Jacinto de agua que se muestran en el cuadro 5.12, se tomaron alícuotas de 50 mL en digitubos y se preservaron con HNO₃ 1:1 cada una de ellas, luego cada digitubo se etiquetó como se muestra en el cuadro 5.15 y finalmente digerados según el método APHA 3112-b descritos en el anexo 1. De todas estas muestras se escogió la muestra 8 por duplicado y un blanco reactivo como control. Luego se procedió a analizar las muestras con el equipo de absorción atómica acoplado a un generador de hidruros (vapor frío),

Cuadro 5.15: Identificación de las soluciones residuales de mercurio recolectadas para cada tiempo

Identificación de las muestras SR=solución residual	Tiempo de recolección (horas)	Volumen de muestra (mL)	Preservante HNO ₃ 1:1 (ml)
M-1-D-Hg(SR)	24	50	1
M-2-D-Hg(SR)	48	50	1
M-3-D-Hg(SR)	72	50	1
M-4-D-Hg(SR)	96	50	1
M-5-D-Hg(SR)	120	50	1
M-6-D-Hg(SR)	120	50	1
M-7-D-Hg(SR)	144	50	1
M-8-D-Hg(SR)	168	50	1
M-8-D-Dup-Hg(SR)	192	50	1
BK	192	50	1

5.11. Determinación de cadmio (II) y mercurio (II) en la raíz, tallo y hojas para una muestra de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Para determinar la concentración asimilada por la planta en cada parte (raíz, tallo y hojas) se escogió como muestra a la planta codificada por M-7-D(P) para el cadmio (II) y la M-4-D(P) para el mercurio (II) como se muestran en el cuadro 5.10, de las cuales se pesaron aproximadamente 5 gramos de muestra húmeda de la raíz, del tallo y de las hojas para ambas muestras tal como se observa en el cuadro 5.16.

Cuadro 5.16: Identificación y pesos de las muestras de cadmio (II) (7 días) y mercurio (II) (4 días)

Identificación de las muestras P=Planta	Parte de la planta	Peso húmedo de muestras (g)	Tiempo de recolección (horas)
M-7-D-Cd(P)	Raíz	5,083	168
	Tallo	5,155	
	Hojas	5,081	
M-4-D-Hg(P)	Raíz	5,074	96
	Tallo	5,050	
	Hojas	5,009	

CAPÍTULO VI
RESULTADOS Y
DISCUSIÓN DE
RESULTADOS

6 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Determinación de la dosis óptima de nutrientes para la viabilidad de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Luego que las muestras de Jacinto de agua fueron sometidas a diferentes dosis de nutrientes como se describe en el cuadro 5.7, durante varios días en el laboratorio a temperatura de 25 ± 2 °C, se observó que algunas de estas se secaban, morían y otras crecían con nuevas hojas y tallos. Luego de 25 días la muestra con dosis A= 1 mL y B= 0,5 mL se mantuvo con hojas y tallos verdes, desarrollando algunas hojas en tamaño, gracias a los nutrientes que aprovechó y a partir de este tiempo comenzó a secar y perder tamaño lentamente, por falta de nutrientes hasta el día 28 tal como se aprecia en cuadro 6.1.

Cuadro 6.1: Resultados de tiempo de supervivencia de cada muestra

Muestra N°	Solución "A" (mL)	Solución "B" (mL)	Tiempo de supervivencia (días)
1	0,5	0,5	23
2	1	0,5	>25
3	1	1	22
4	1,5	1	18
5	2	1	19
6	2	2	17
7	2,5	1	15
8	2,5	2	15
9	5	2	14
10	5	2,5	14
11	5	5	12
12	10	5	10

En la figura 6.1, se observa una muestra de Jacinto de agua a una concentración de $A= 1 \text{ mL}$ y $B= 0,5 \text{ mL}$, Luego de 22 días, la planta está en buen estado, con hojas y tallos verdes, cumpliendo el objetivo de mantener el mayor tiempo de vida de esta planta. Esta información importante nos servirá para continuar con la optimización de los demás parámetros para poder alcanzar nuestro objetivo final.

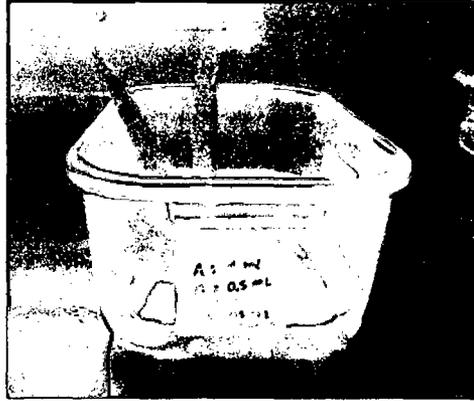


Figura 6.1: Foto del Jacinto de agua a una concentración de $A=1 \text{ mL}$ y $B=0,5 \text{ mL}$, luego de 22 días.

6.2 Efecto del pH sobre la viabilidad de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) y la solubilidad del metal

La influencia del pH en la asimilación de los diversos elementos es bastante conocida para el caso de los macro y micro nutrientes, habiéndose determinado rangos de pH entre los cuales la solubilidad aumenta o disminuye. Es de suma importancia resaltar que el efecto del pH parece ser el más importante sobre la absorción de metales.

El cuadro 6.2 resume el efecto del pH en la fitoremediación de cadmio y mercurio. A bajos valores de pH, estos metales son bastante solubles incluso en presencia de los nutrientes. Desafortunadamente, un pH menor de 4 es nocivo para la planta, provocando el fraccionamiento de la raíz en menos de 4 días. Por otro lado, el ion cadmio (II) y mercurio (II) divalentes empiezan a precipitar como hidróxidos en presencia de los nutrientes alrededor de $\text{pH} > 7$. Combinando ambos aspectos, se dedujo que pH 5 es el valor óptimo porque mantiene viva a la planta por más de 18 días para el cadmio (II) y 20 días para el mercurio (II). Estudios realizados determinaron el rol del pH en un proceso similar, encontrando que el pH ejerce un fuerte efecto: (i) en la formación de iones complejos del metal en solución acuosa, los cuales presentan diferentes ligandos que modifican la acidez y morfología del metal en solución y (ii) en el estado químico de los centros activos de los adsorbentes.^[79,80] Esta última propiedad no ha sido observada sólo en adsorbentes cuyos centros activos son iónicos. Blanco D. y colaboradores^[79] determinaron que la capacidad adsorbente del hongo comestible *Lentinus edodes* se debe a la presencia de proteínas y principalmente a polisacáridos, como *lentinano*, y también se encuentra condicionada al pH. Asimismo, debemos tener en cuenta que la solubilidad del cadmio (II) y mercurio (II) también es afectada por la presencia de diversos aniones quelantes provenientes de las soluciones nutrientes (por ejemplo fosfatos, nitratos y sulfatos), tomando más complejo aún este fenómeno.

El efecto del pH afecta la viabilidad de la planta, debido a que las enzimas que forman parte de la planta no toleran pHs bajos, desde que los mecanismos celulares de vital importancia se ven afectados por altas concentraciones de iones hidronio.^[81,82]

Cuadro 6.2: Resultados luego de la optimización del pH y la solubilidad del metal

Identificación de soluciones	Concentración de cadmio (II) y mercurio (II) (mg/L)	pH de soluciones	Tiempo de supervivencia (días)		Presenta precipitado	
			Cd (II)	Hg(II)	Cd (II)	Hg(II)
1	1	1,5	4	6	No	No
2	1	2	5	8	No	No
3	1	3	9	10	No	No
4	1	4	10	15	No	No
5	1	5	>18	>20	No	No
6	1	6	17	14	No	No
7	1	7	14	15	No	No
8	1	8	15	13	Si	Si

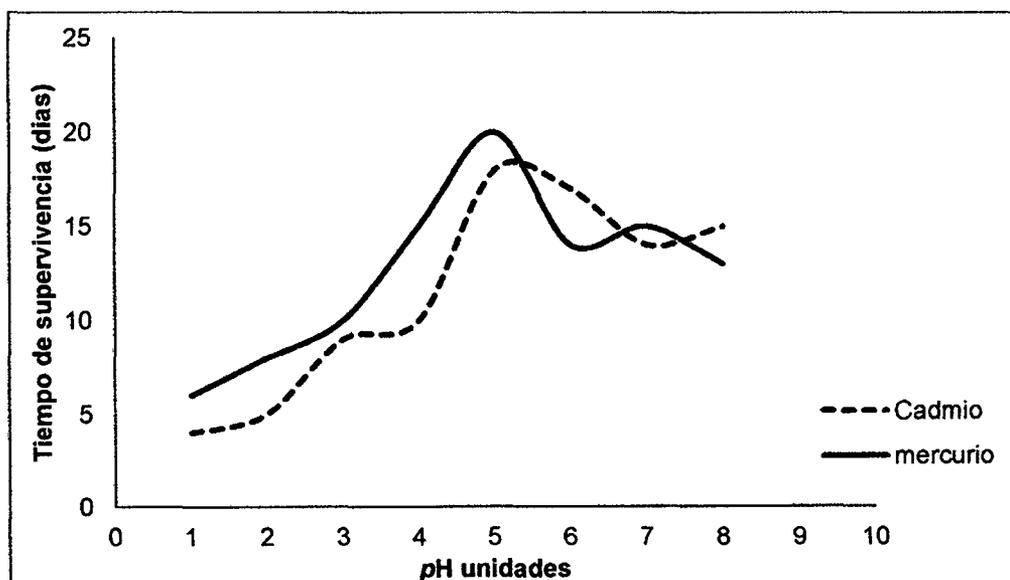


Figura 6.2: Curva del tiempo de supervivencia en días para 1 ppm de cadmio (II) y mercurio (II) en función del pH a una dosis de nutrientes A=1 mL y B=0,5 mL y temperatura 25 ± 2 °C.

En la figura 6.2, se aprecia una curva de tiempo de supervivencia (en días) vs pH, donde se aprecia un comportamiento de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) al variar el pH de la solución que contiene 1 ppm de cadmio (II) y análogamente otra solución con un 1 ppm de mercurio (II), Para ambos experimentos se obtuvo que para el pH 5 se obtiene el mayor tiempo de supervivencia para el Jacinto de agua y se evita la precipitación hidróxidos de cadmio (II), mercurio (II) y de los nutrientes presentes en la solución.

6.3 Determinación de la concentración óptima de los metales para la viabilidad de las plantas

Se determinó la concentración de cadmio (II) y mercurio (II) a la cual la planta presenta fitotoxicidad.⁹ Como se aprecia en el cuadro 6.3, existe una relación inversamente proporcional entre la concentración del metal y el tiempo de vida de la planta. A una concentración de 5 mg/L, la planta permanece viva por tiempo suficiente para cumplir su tarea destoxicante. No todas las plantas son capaces de resistir altas concentraciones de metales pesados, *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), es una de las pocas especies capaces de acumular metales tóxicos, hasta ciertos límites, sin alterar su metabolismo. Se piensa que el reemplazo de cationes divalentes como magnesio y calcio intracelular por metales pesados isovalentes como cobre, plomo y cadmio causa desequilibrio en los sistemas vivos al insertarse en los sistemas enzimáticos de forma irreversible.^[70] Este mismo comportamiento ha sido encontrado en sistemas inertes que también son capaces de eliminar contaminantes de soluciones acuosas,^[79] sustentan que el pre-tratamiento de *Lessonia trabeculata* con cloruro de calcio, promueve el entrecruzamiento de cadenas alginicas mediante la formación de geles y en consecuencia, aumenta la capacidad de adsorción de cadmio divalente. Se piensa que el ión cadmio posee mayor afinidad a grupos funcionales con alta densidad electrónica debido a su alta relación masa-carga y acidéz de Lewis, desplazando fácilmente a pequeños cationes divalentes.^[80] De lo expuesto, se podría concluir que los metales pesados son absorbidos en mayor proporción y con mayor velocidad que otros iones divalentes por la misma razón, absorbiéndose en sitios activos de enzimas y sistemas celulares. En las figuras 6.3 y 6.4, se muestran las fotografías de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) luego de ser sometidas durante 10 días a una dosis conocida de nutrientes (A=1 mL, B=0,5 mL), pH 5 y una concentración de cadmio (II) y mercurio (II) de 5 ppm. Se aprecia ambas muestras en buen estado con hojas y tallos verdes. Estas muestras resisten 15 días para el Cd (II) y 14 días para el Hg (II) como se puede apreciar en el cuadro 6.3. A partir de esos días la planta se comienza a secar y finalmente muere por la fitotoxicidad del metal.

⁹ **Fitotoxicidad** : Daño producido al vegetal por algún ingrediente químico que posee el producto fitosanitario.

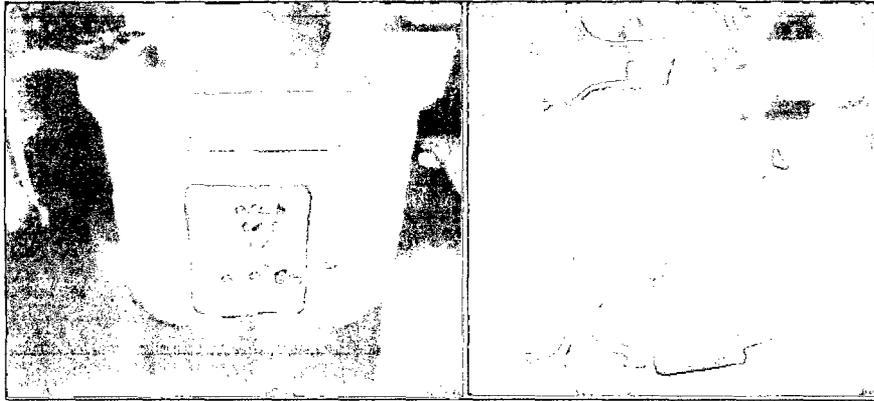


Figura 6.3: *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) después ser sometidas durante 10 días en una solución de 5 mg/L de cadmio (II) a pH=5,



Figura 6.4: *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) después de ser sometidas durante 10 días en una solución de 5 mg/L de mercurio (II) a pH 5.

Cuadro 6.3: Resultados de la optimización de los metales en función al tiempo de supervivencia a diferentes concentraciones del metal

Metal en estudio	Concentración del la solución (mg/L)	pH de solución	Tiempo de supervivencia del Jacinto de agua (días)
Cadmio (II)	1	5	16
	5	5	15
	10	5	11
	15	5	9
	20	5	6
Mercurio (II)	1	5	15
	5	5	14
	10	5	12
	15	5	10
	20	5	6
	25	5	5

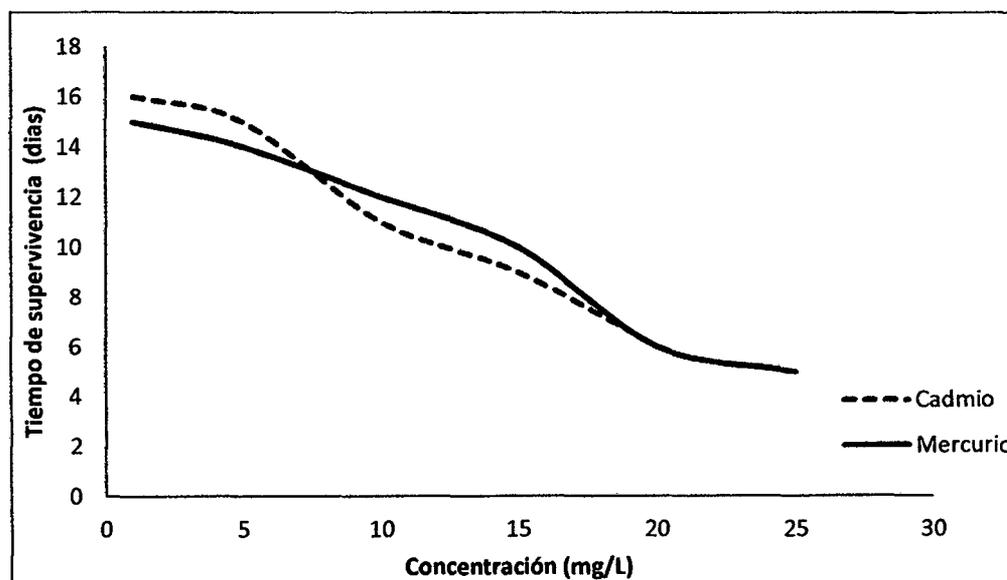


Figura 6.5: Curva del tiempo de supervivencia del Jacinto de agua vs la concentración del metal.

6.4 Determinación de la concentración de cadmio (II) y mercurio (II) presentes en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Estos metales pesados, Cd (II) y Hg (II), son no esenciales, ni cumplen una función fisiológica conocida en plantas. Otros elementos como Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn, son esenciales para el crecimiento y el metabolismo normal de las plantas.

Los metales pesados como Cd (II) y Hg (II) son altamente tóxicos, debido a su reactividad con los átomos de S y N presentes en los aminoácidos y las proteínas.^[83] Contrario a los contaminantes de origen orgánico, estos metales pesados no pueden ser degradados química u orgánicamente, por lo que una de las alternativas para la remoción de aguas contaminados con estos iones metálicos es la fitoextracción, la cual consiste en la absorción y acumulación de metales pesados en la parte aérea de plantas hiperacumuladoras como *Eichhornia crassipes*. Esta planta puede presentar diferentes mecanismos de tolerancia en respuesta al exceso de Cd (II) y Hg (II), incluida la reducción del transporte a través de membrana de exclusión, formación de péptidos ricos en grupos tiólicos (fitoquelatinas y metalotioneínas), quelatación por ácidos orgánicos, aminoácidos y compartimentación del metal en estructuras subcelulares.

La acumulación de los iones metálicos Cd (II) y Hg(II) por *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) se da probablemente en un proceso complejo, desarrollado en varias etapas: a) bioactivación del ion metálico en la rizosfera, b) transporte del ión metálico a través de la membrana plasmática de las células radiculares, c) traslocación del ión metálico a través del xilema¹⁰, d) detoxificación y secuestro del ión metálico por la planta.^[67]

En la planta en estudio, entre los principales grupos de quelantes de iones metálicos que se conocen se incluyen a las fitoquelatinas, metalotioneínas, ácidos orgánicos y aminoácidos. El ión metálico Cd (II), es el más fuerte inductor de FQs (fitoquelatinas) en vivo y es el elemento que forma complejos más estables con FQs, debiendo su gran afinidad al azufre.^[69] Sin embargo, la síntesis de FQs no está relacionada solamente con este elemento.^[84] Estudios en la síntesis de FQs en una suspensión de cultivo de células de *R. serpentina*, expuesta a metales pesados, concluyeron que los metales inducen la síntesis de FQs en el siguiente orden decreciente: $Cd^{2+} < Pb^{2+} < Zn^{2+} < Sb^{3+} < Ag^{+} < Hg^{2+} < As^{5+} < Cu^{2+} < Sn^{2+} < Au^{3+} < Bi^{3+}$. Según los mismos autores, iones de Ni, Te, W y Se no indujeron la síntesis de FQs.

El Cd (II) es el ión metálico que presenta mayor fuerza de unión para algunas metalotioneínas (MTs) y desplaza a otros iones aunque se consideren con mayor afinidad para la molécula. Expresamos seguidamente en orden creciente, de izquierda a derecha, la fuerza de unión con mayor energía de los iones principalmente tóxicos para las apometalotioneínas, entre ellos Zn^{2+} y Fe^{2+} son menos tóxicos que el Cu^{2+} , y los tres son esenciales y se hallan en mayores concentraciones en el hombre: $Fe < Zn < Pb < Bi < Cu, Ag, Hg < Cd$.^[85]

¹⁰ **Xilema:** El xilema (del griego clásico ξυλον, "madura"), también es conocido como leña, el cual se lo reconoce como un tejido vegetal lignificado de conducción que transporta líquidos de una parte a otra de las plantas vasculares. Transporta agua, sales minerales y otros nutrientes desde la raíz hasta las hojas de las plantas

Luego de ser recolectadas las muestras de Jacinto de agua se digitaron según el método EPA 200,3 con HNO₃-H₂O₂ y el digestado fue enrasado a un volumen final de 50 mL con agua ultrapura. Se procedió a la lectura de estas muestras con el equipo de ICP-OES para el cadmio y el absorción atómica (vapor frío) para el mercurio (II). Se tomó por duplicado la muestra correspondiente al quinto día. Estas muestras son las que se aprecian en el cuadro 5.10 y los resultados obtenidos de las alícuotas tomadas de la digestión de tejidos, se muestran en el cuadro 6.4, valores en mg/L para el cadmio (II) y mercurio (II) respectivamente.

Cuadro 6.4 : Lectura en mg/L de cadmio (II) y mercurio (II) medidas en las alícuotas tomadas

Identificación de las muestras P=Plantas	Volumen final de la alícuota (mL)	Lectura de cadmio λ=228,8 nm LD=0,01 mg/L (mg/L)	Lectura de mercurio λ=253,65 nm LD=0,00005 mg/L (mg/L)
M-1-D(P)	50	1,01	0,54
M-2-D(P)	50	13,44	15,46
M-3-D(P)	50	11,67	7,46
M-4-D(P)	50	13,53	15,36
M-5-D(P)	50	11,39	11,49
M-5-D-Dup(P)	50	9,75	10,15
M-6-D(P)	50	14,62	12,49
M-7-D(P)	50	16,56	15,60
M-8-D(P)	50	14,27	11,91
BK	50	0,00	0,00

Nota: M-1-D, significa; muestra recolectada en el primer día y así sucesivamente hasta M-8-D (muestra recolectada en el octavo día) y BK significa la muestra tomada como blanco.

Para convertir los mg/L de cada muestra en mg/kg empleamos la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración del metal (Cd o Hg), mg/kg (base húmeda)} = \frac{A \times B}{G \text{ muestra}} \dots\dots\dots(1)$$

Donde :

A= Concentración del metal (Cd ó Hg) en la solución digestada (mg/L)

B= Volumen final de la solución digestada (mL)

G= Peso de la muestra en (g)

Finalmente, los resultados obtenidos acerca de la concentración en mg/kg de cadmio (II) y mercurio (II) en cada muestra de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) son mostrados en el cuadro 6.5.

Cuadro 6.5: Concentraciones de cadmio (II) y mercurio (II) en mg/kg presentes en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua),

Identificación de las muestras P=Plantas	Concentración de cadmio $\lambda=228,8$ nm (mg/kg)	Concentración de mercurio $\lambda=253,65$ nm (mg/kg)
M-1-D(P)	10,10	5,40
M-2-D(P)	134,26	154,44
M-3-D(P)	116,65	75,5
M-4-D(P)	135,22	153,51
M-5-D(P)	113,76	114,85
M-5-D-Dup(P)	97,48	101,48
M-6-D(P)	146,14	124,85
M-7-D(P)	165,47	155,87
M-8-D(P)	142,66	119,06
BK	0	0

Los valores que se muestran en el cuadro 6.6 se obtienen de multiplicar la concentración en mg/L del metal de las lecturas obtenidas por el volumen final de la alícuota (50 mL) y en el caso de la concentración inicial de solución se multiplicó por el volumen de 1 litro. Se aprecian los resultados del porcentaje de sorción del cadmio (II) y mercurio (II) de cada muestra sometida a una solución de concentración 5 mg/L de cadmio (II) y mercurio (II). Para ambos metales se obtiene que en 7 días de sometida la muestra se alcanza el máximo porcentaje de absorción, siendo 16,56 % para el cadmio (II) y 15,6 % para el mercurio (II). Esto se da cuando ambos metales son sometidos juntos en la misma solución.

Cuadro 6.6: Resultados del porcentaje de absorción (%A) de cadmio (II) y mercurio (II) en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) para cada muestra analizada

Metal en estudio	Identificación de la muestra	Masa inicial del metal en solución (mg)	Masa del metal obtenida en <i>Eichhornia crassipes</i> (mg)	Porcentaje de absorción del metal %A
Cadmio (II)	M-1-D(P)	5,000	0,051	1,01
	M-2-D(P)	5,000	0,672	13,44
	M-3-D(P)	5,000	0,584	11,67
	M-4-D(P)	5,000	0,677	13,53
	M-5-D(P)	5,000	0,570	11,39
	M-5-D-Dup(P)	5,000	0,488	9,75
	M-6-D(P)	5,000	0,731	14,62
	M-7-D(P)	5,000	0,828	16,56
	M-8-D(P)	5,000	0,714	14,27
	BK	5,000	0,000	0
Mercurio (II)	M-1-D(P)	5,000	0,027	0,54
	M-2-D(P)	5,000	0,773	15,46
	M-3-D(P)	5,000	0,373	7,46
	M-4-D(P)	5,000	0,768	15,36
	M-5-D(P)	5,000	0,575	11,49
	M-5-D-Dup(P)	5,000	0,508	10,15
	M-6-D(P)	5,000	0,625	12,49
	M-7-D(P)	5,000	0,780	15,6
	M-8-D(P)	5,000	0,596	11,91
	BK	5,000	0,000	0

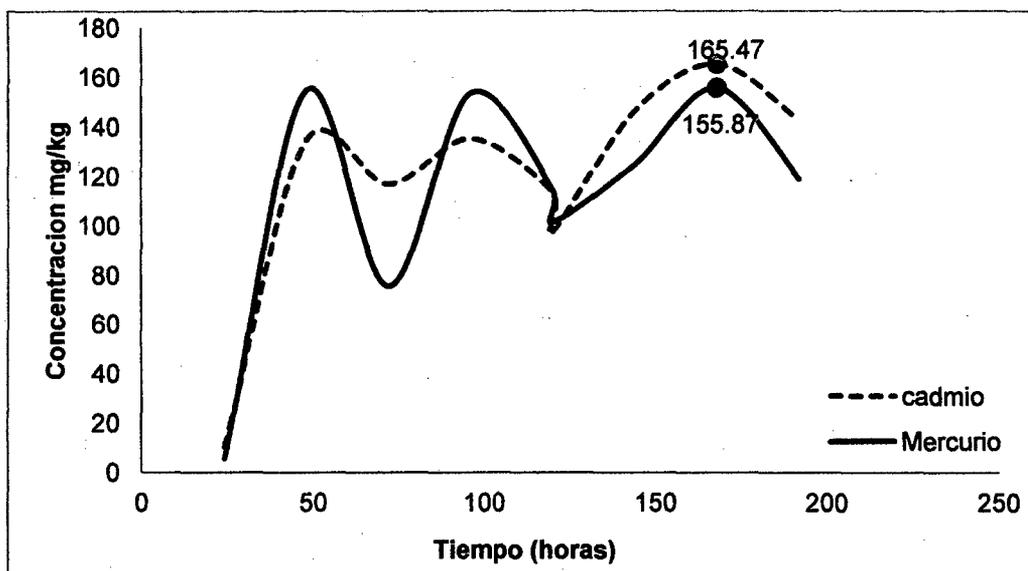


Figura 6.6: Curva de concentración en mg/kg de cadmio (II) y mercurio (II) en función del tiempo en horas presentes en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).

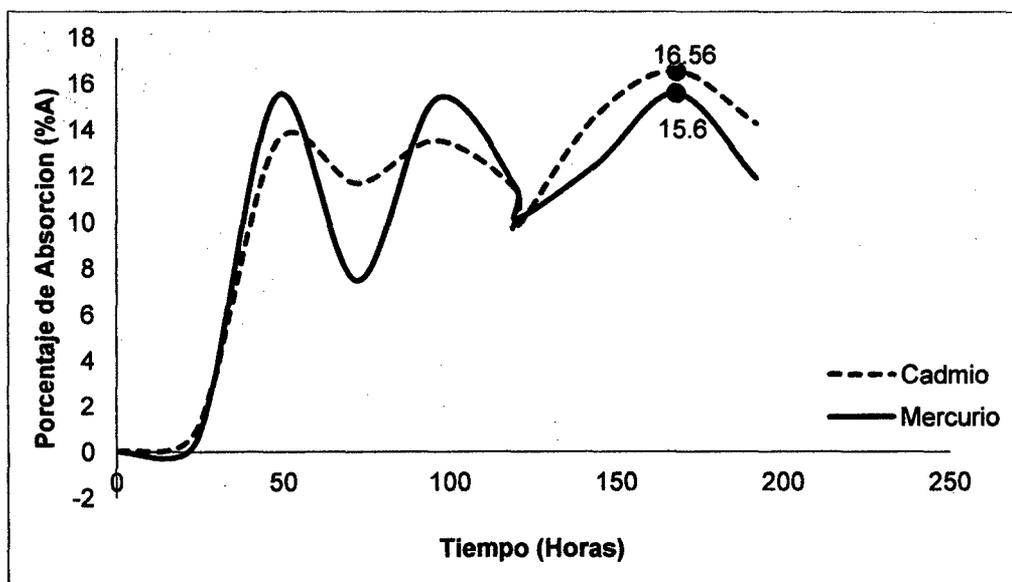


Figura 6.7: Curva de porcentaje de absorción (% A) de cadmio (II) y mercurio (II) en función del tiempo en horas.

En las figuras 6.6 y 6.7 se muestran las gráficas de concentración del metal en función del tiempo en horas y análogamente el porcentaje de absorción (% A) de cadmio (II) y mercurio (II) en función del tiempo en horas. En ambos gráficos se puede observar que los picos más altos de absorción se dan para un tiempo de 7 días o su equivalente a 168 horas, tiempo óptimo para nuestros objetivos trazados. Para la muestra M-7-D(P), se obtuvieron los resultados máximos que fueron **16,56 %** de absorción para el cadmio (II) y **15,6 %** para el mercurio (II).

La ligera diferencia entre el porcentaje de absorción de estos iones se debe probablemente a la estabilización de los complejos de cadmio (II) con respecto a los complejos formados con el mercurio (II). Según el cuadro 3.2, que muestra las constantes de estabilidad del cadmio (II) y mercurio (II) frente a un ligando tiolato, siendo los valores $\text{Log}K_{\text{Cd}} = 5,6$ y $\text{Log}K_{\text{Hg}} = 10,2$ a un $\text{pH } 7$. Estos valores muestran que hay una mayor estabilidad por parte del mercurio (II), sin embargo se deben tener en cuenta otros factores como la solubilidad de la especie que libera el ion metálico, la energía de enlace entre el ion metálico y el azufre (M-S) y la accesibilidad del metal al nucleófilo. Siendo este último factor más favorable para el Cd (II) debido a su número de coordinación 4 (tetraédrico) lo cual explica porque absorbe un poco más que el Hg(II), siendo ambos muy afines a los complejos que contiene la planta.

Según el estudio realizado por Attila Jancsó ^[86] el dodecapéptido investigado, posee dos cisteínas y dos residuos de aspartato como posibles sitios de unión del metal, se observó que el exceso de cadmio (II) sobre zinc (II) conduce a la formación de especies dinucleares y la liberación completa de zinc (II) a partir del péptido. En base a los resultados del dodecapéptido se puede considerar como un candidato prometedor para la unión de iones metálicos tóxicos en aplicaciones prácticas, sobre todo para los iones de mercurio (II). Con esta información se puede explicar cómo los iones metálicos Cd (II) y Hg (II) pueden sustituir mediante un intercambio iónico a otros iones metálicos presentes en la planta como el zinc (II), Fe (II), Cu (II), etc y acomplejarse con las proteínas y aminoácidos que componen la planta.

La afinidad de los ácidos blandos (Cd^{2+} y Hg^{2+}) por bases blandas (El asufre de las fitoquelatinas, metalotioneínas, tioles, etc), es principalmente de naturaleza covalente. Es por esta razón que se mantienen unidos los iones metálicos dentro de los tejidos celulares de la planta.

La tendencia de la curva de porcentaje de absorción (%A) de cadmio (II) y mercurio (II) en función del tiempo en horas, según la figura 6.7, se debe probablemente a la absorción de estos iones metálicos por los diferentes mecanismos explicados y probablemente a la saturación de estas proteínas, liberando algunos iones para captar los micronutrientes esenciales para la producción de mas fitoquelatinas y/o metalotioneínas, produciéndose la desorción de iones Cd (II) y Hg (II) y por ello se aprecia las tendencias a subir y bajar el porcentaje de absorción a medida que pasa el tiempo, estableciendo probablemente un equilibrio dinámico como el consumo de defensa de la planta.

6.5. Determinación de cadmio (II) en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Luego de ser recolectadas, las muestras de *Eichhornia crassipes* se digitaron según el método EPA 200.3 con $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ y el digestado fue enrasado a un volumen final de 50 mL con agua ultrapura, se procedió a la lectura de estas muestras con el equipo de ICP-OES. Para convertir los mg/L de cada muestra en mg/kg empleamos la ecuación (1) y los valores de los pesos de las alícuotas del cuadro 5.11. Finalmente, se obtienen los resultados mostrados en el cuadro 6.7 de concentración en mg/kg de cadmio en cada muestra de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), Se escogió la muestra del octavo día por duplicado para llevar un control en el análisis y una muestra de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) como blanco.

Cuadro 6.7 : Lecturas en mg/L medidas en las alícuotas tomadas y las concentraciones en mg/kg de cadmio (II)

Identificación de las muestras P=Planta	Volumen final de la alícuota (mL)	Lectura de cadmio $\lambda=228,8$ nm LD=0,01 mg/L (mg/L)	Concentración de cadmio $\lambda=228,8$ nm (mg/kg)
M-1-D-Cd(P)	50	3,87	38,71
M-2-D-Cd (P)	50	4,43	44,33
M-3-D-Cd (P)	50	3,61	36,17
M-4-D-Cd (P)	50	3,86	38,61
M-5-D-Cd (P)	50	5,06	50,85
M-6-D-Cd(P)	50	3,46	34,56
M-7-D-Cd (P)	50	6,41	64,05
M-8-D-Cd (P)	50	4,94	49,39
M-8-D-Dup-Cd (P)	50	4,88	48,78
BK	50	0,00	0

En el cuadro 6.8, se muestran los resultados del porcentaje de absorción (% A) de cadmio (II) en jacinto de agua y vemos que para la muestra tomada el séptimo día (M-7-D-Cd (P)) se obtiene el máxima absorción de cadmio (II) de 6,41 %. En la figura 6.8 y 6.9 se muestran las curvas de concentración en mg/Kg y el porcentaje de absorción (%) en función del tiempo en horas respectivamente donde se puede observar los picos más altos correspondientes al séptimo día.

El mecanismo de decodificación es más complejo que una simple quelación del cadmio (II) por las fitoquelatinas (FQ_n ; $n=2-11$). El Cd (II) debe unirse probablemente al glutatión (GSH) o Fitoquelatinas (FQ_n), formando complejos tiolato-cadmio, activando la enzima fitoquelatin sintasa (PCS). Las fitoquelatinas sintetizadas en el citosol enlazan a los iones Cd, formando los complejos CdFQ_n de bajo peso molecular, entrando así en las vacuolas a través de transportadores de tipo

ABC¹¹. Dentro de estas los complejos CdFQ_n se combinan entre si, uniéndose a mas iones Cd (II) y formando los complejos CdFQ_n de alto peso molécula, que además están estabilizados por átomos de azufre.^[63]

Desde el punto de vista funcional las FQ_n son análogas a las metalotioneínas (MTs).^[87] De hecho ambas tienen la posibilidad ,gracias a los numerosos grupos sulfhidrilos que poseen, de enlazar los metales tóxicos para el organismo y, por consiguiente, tener luego una acción detoxificante.

Las FQ_n, debido a su capacidad de secuestrar los metales, pueden contribuir a las homeostasis celular del Cd (II), esta es considerada la principal función de las FQ_n, esta detoxificación metálica ha sido demostrada utilizando Cd o el Cu en cultivo de células vegetales en suspensión.^[53,88,87]

Cuadro 6.8: Resultados del porcentaje de absorción (%A) de cadmio (II) en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) para cada muestra analizada

Metal en estudio	Identificación de la muestra	Masa inicial del metal en solución (mg)	Masa del metal obtenida en <i>Eichhornia crassipes</i> (mg)	Porcentaje de absorción del metal %A
Cadmio (II)	M-1-D-Cd(P)	5,000	0,194	3,87
	M-2-D-Cd (P)	5,000	0,222	4,43
	M-3-D-Cd (P)	5,000	0,181	3,61
	M-4-D-Cd (P)	5,000	0,193	3,86
	M-5-D-Cd (P)	5,000	0,253	5,06
	M-6-D-Cd(P)	5,000	0,173	3,46
	M-7-D-Cd (P)	5,000	0,321	6,41
	M-8-D-Cd (P)	5,000	0,247	4,94
	M-8-D-Dup-Cd (P)	5,000	0,244	4,88

¹¹ Los transportadores de membrana dependientes de ATP (ABC): Son proteínas ampliamente distribuidas y conservadas evolutivamente que participan en procesos de transporte y detoxificación celular. De forma fundamental transportan metabolitos y tóxicos cuya expulsión beneficia y protege las funciones celulares.

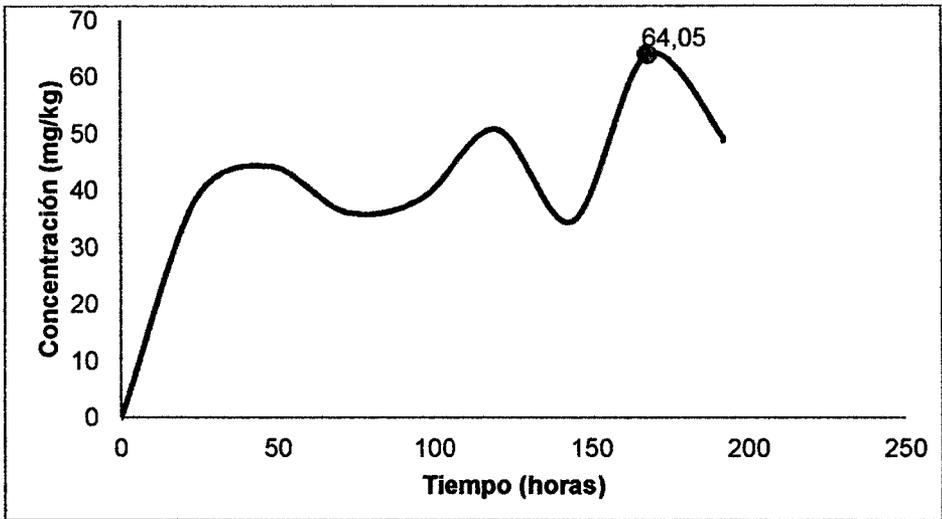


Figura 6.8: Curva de concentración (mg/kg) de cadmio (II) en función del tiempo en horas para cada muestra analizada.

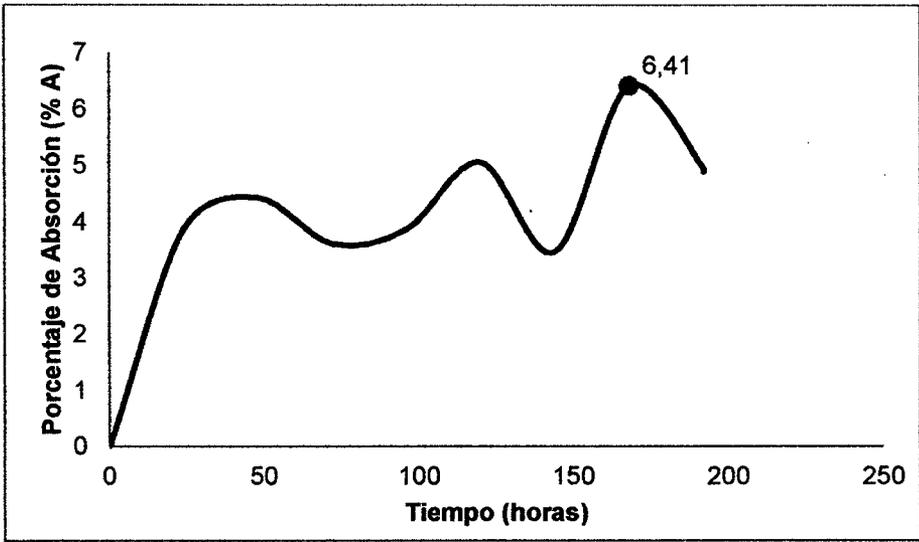


Figura 6.9: Curva de porcentaje de absorción (% A) del cadmio (II) en función del tiempo en horas.

6.6. Determinación de mercurio (II) en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua),

Luego de ser recolectadas las muestras de *Eichhornia crassipes*, se digestaron según el método EPA 200.3 con $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ y el digestado fue enrasado a un volumen final de 50 mL con agua ultrapura. Se procedió a la lectura de estas muestras con el equipo de absorción atómica acoplado a un generador de hidruros (vapor frío). Finalmente, para convertir los mg/L de cada muestra en mg/kg empleamos la ecuación (1) y se obtiene el cuadro 6.9 de concentración de mercurio (II) en mg/kg en cada muestra analizada de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua).

Cuadro 6.9: Lecturas en mg/L de mercurio (II), medidas en las alícuotas tomadas y las respectivas concentraciones en mg/kg de mercurio (II)

Identificación de las muestras p=planta	Volumen final de la alícuota (mL)	Lectura de mercurio $\lambda=253,65 \text{ nm}$ LD=0,00005 mg/L (mg/L)	Concentración de mercurio $\lambda=253,65 \text{ nm}$ (mg/kg)
M-1-D-Hg(P)	50	15,23	152,27
M-2-D- Hg(P)	50	4,00	39,79
M-3-D- Hg(P)	50	7,98	79,37
M-4-D- Hg(P)	50	4,39	43,87
M-5-D- Hg(P)	50	3,64	36,38
M-6-D- Hg(P)	50	10,96	109,29
M-7-D- Hg(P)	50	7,64	76,38
M-8-D- Hg(P)	50	4,86	48,58
M-8-D-Dup-Hg(P)	50	5,02	50,18
BK	50	0,00	0

Cuadro 6.10: Resultados del porcentaje de absorción (% A) de mercurio (II) en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) para cada muestra analizada

Metal en estudio	Identificación de la muestra	Masa inicial del metal en solución (mg)	Masa del metal obtenida en <i>Eichhornia crassipes</i> (mg)	Porcentaje de absorción del metal %A
Mercurio (II)	M-1-D-Hg(P)	5,000	0,762	15,23
	M-2-D- Hg(P)	5,000	0,200	4
	M-3-D- Hg(P)	5,000	0,399	7,98
	M-4-D- Hg(P)	5,000	0,220	4,39
	M-5-D- Hg(P)	5,000	0,182	3,64
	M-6-D- Hg(P)	5,000	0,548	10,96
	M-7-D- Hg(P)	5,000	0,382	7,64
	M-8-D- Hg(P)	5,000	0,243	4,86
	M-8-D-Dup-Hg(P)	5,000	0,251	5,02

En el cuadro 6.10, se muestran los resultados del porcentaje de absorción (% A) de mercurio (II) en Jacinto de agua y vemos que para la muestra tomada después de un día (M-1-D-Hg(P)) se obtiene el máxima absorción de mercurio (II) de 15,23 %. En la figura 6.10 y 6.11 se muestran las curvas concentración en mg/kg en función del tiempo en horas y el porcentaje de absorción (%) en función del tiempo en horas respectivamente donde se nota los picos más altos correspondientes al primer día o después de 24 horas.

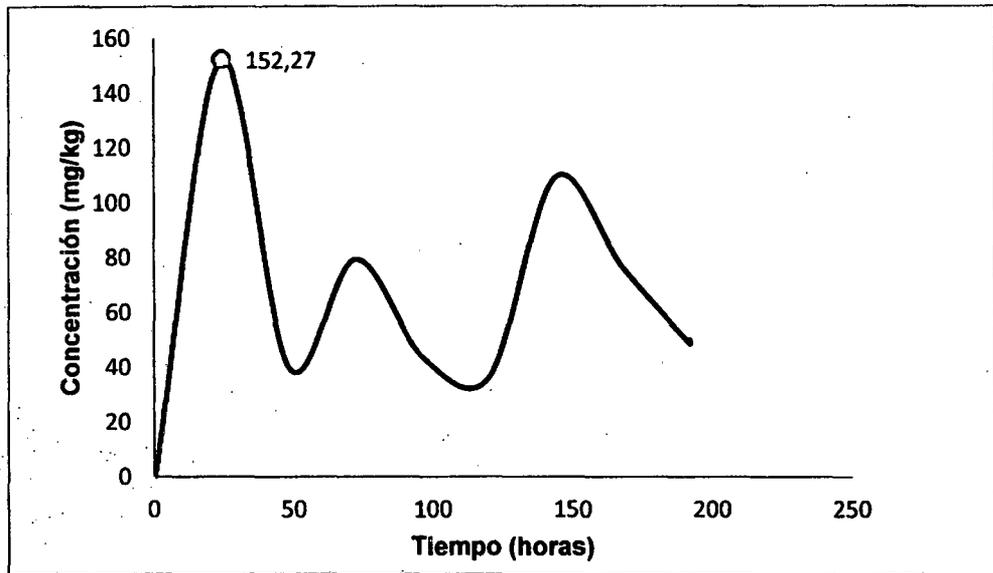


Figura 6.10: Curva de concentración (mg/kg) de mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada muestra analizada.

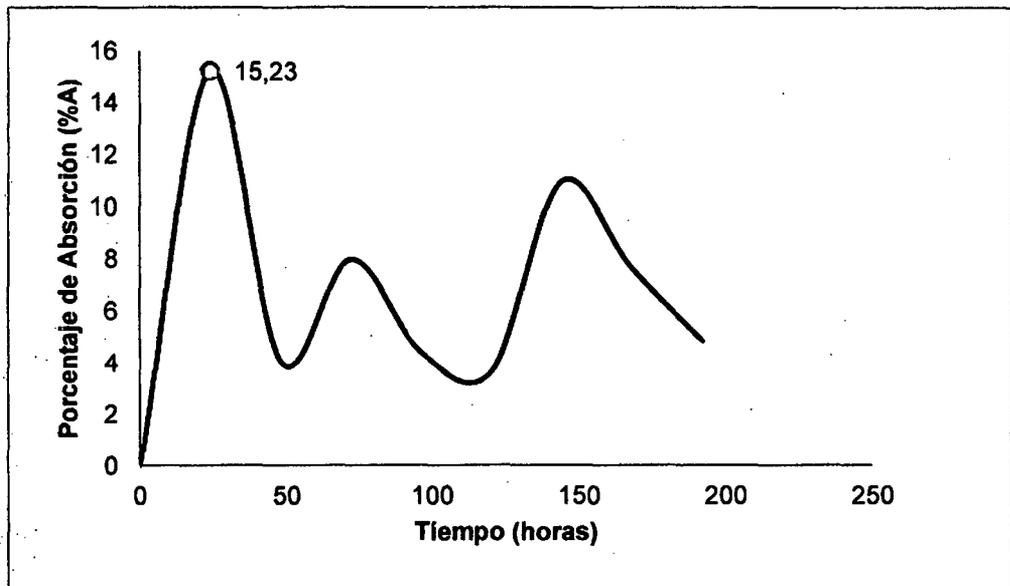


Figura 6.11: Curva de porcentaje de absorción (%A) de mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada muestra analizada.

Si bien la información acerca del mecanismo de incorporación del Hg es escasa, está generalmente aceptado que la captación del ión metálico Hg(II) puede ocurrir a través de los canales transportadores de micronutrientes esenciales.^[89] Dada la similitud química entre el Hg y varios nutrientes esenciales como el Zn, Cu o Fe, los transportadores de estos elementos podrían ser posibles candidatos para favorecer el ingreso de Hg a las células vegetales. También se ha informado que Hg(II) preferentemente se une a ligandos ricos en S y N, tales como las fitoquelatinas (FQ_n), metalotioneínas y los aminoácidos.^[90]

En cuanto a la detoxificación de este metal, un mecanismo general comprende su unión a fitoquelatinas y/o metalotioneínas y la posterior incorporación del complejo a la vacuola. Investigaciones recientes,^[91] encontraron que el Hg se hallaba principalmente asociado a un péptido conteniendo varios residuos de S en raíces y tallos de plantas de *Chromolaena odorata* expuestas a Hg(NO₃)₂. También, se describieron que dos transportadores tipo ABCC, AtABCC1 y AtABCC2 de vacuolas, resultarían importantes en el mecanismo de detoxificación de Cd y Hg dependiente de fitoquelatinas.^[92]

6.7. Determinación de cadmio (II) y mercurio (II) en las soluciones residuales tratadas con *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Luego de que las muestras fueron digestadas y enrasadas a un volumen final de 50 mL con agua ultrapura, se procedió a la lectura de estas muestras con el equipo de ICP-OES para el cadmio (II) y absorción atómica acoplado a un generador de hidruros (vapor frío) para el mercurio (II) obteniendo los siguientes resultados mostrados en el cuadro 6.11 para cada muestra analizada.

Cuadro 6.11: Concentraciones de cadmio (II) y mercurio (II) obtenidas de las soluciones residuales

Identificación de las muestras SR=Solución residual	Volumen final de la alicuota (mL)	Lectura de cadmio $\lambda=228,8$ nm LD=0,01 mg/L (mg/L)	Lectura de mercurio $\lambda=253,65$ nm LD=0,00005 mg/L (mg/L)
M-1-D(SR)	50	4,05	4,49
M-2-D(SR)	50	2,76	1,07
M-3-D(SR)	50	2,53	0,99
M-4-D(SR)	50	2,89	1,02
M-5-D(SR)	50	2,09	1,01
M-5-D-DUP(SR)	50	1,92	1,03
M-6-D(SR)	50	2,24	1,01
M-7-D(SR)	50	2,22	0,97
M-8-D(SR)	50	1,90	0,98
BK	50	0,00	0,00

En el cuadro 6.12, se muestran los resultados del porcentaje de remoción (%R) de cadmio (II) y mercurio (II) para cada solución residual analizada. El porcentaje de remoción se calculó empleando la ecuación (2) y tomando los datos del cuadro 6.11:

$$\text{Porcentaje de remoción (\%R)} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

El máximo porcentaje de remoción para el cadmio es de 62 % y corresponde a la muestra tomada después del octavo día, mientras que para el mercurio se obtiene un 80,6 % y corresponde a la muestra tomada después del séptimo día.

Cuadro 6.12: Resultados del porcentaje de remoción (%R) de cadmio (II) y mercurio (II) en cada solución residual analizada

Metal en estudio	Identificación de la muestra	Concentración inicial la solución (C _o) (mg/L)	Concentración final obtenida (C _i) (mg/L)	Porcentaje de remoción del metal $\%R = \frac{C_o - C_i}{C_o} \times 100$
Cadmio (II)	M-1-D(SR)	5	4,05	19
	M-2-D(SR)	5	2,76	44,8
	M-3-D(SR)	5	2,53	49,4
	M-4-D(SR)	5	2,89	42,2
	M-5-D(SR)	5	2,09	58,2
	M-5-D-DUP(SR)	5	1,92	61,6
	M-6-D(SR)	5	2,24	55,2
	M-7-D(SR)	5	2,22	55,6
	M-8-D(SR)	5	1,90	62
Mercurio (II)	M-1-D(SR)	5	4,49	10,2
	M-2-D(SR)	5	1,07	78,6
	M-3-D(SR)	5	0,99	80,2
	M-4-D(SR)	5	1,02	79,6
	M-5-D(SR)	5	1,01	79,8
	M-5-D-DUP(SR)	5	1,03	79,4
	M-6-D(SR)	5	1,01	79,8
	M-7-D(SR)	5	0,97	80,6
	M-8-D(SR)	5	0,98	80,4

En la figura 6.12 se muestran las curvas de concentración (mg/L) de cadmio y mercurio en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada, destacando los picos más bajos de 1,9 mg/L para el cadmio (II) y 0,97 mg/L para el mercurio (II). Ambos picos representan la máxima absorción de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), es por eso que en la figura 6.13 se muestran los picos máximos de porcentaje de remoción, para los mismos tiempos, 192 horas (80,6 %) y 168 horas (62 %) horas para el cadmio (II) y mercurio (II), respectivamente.

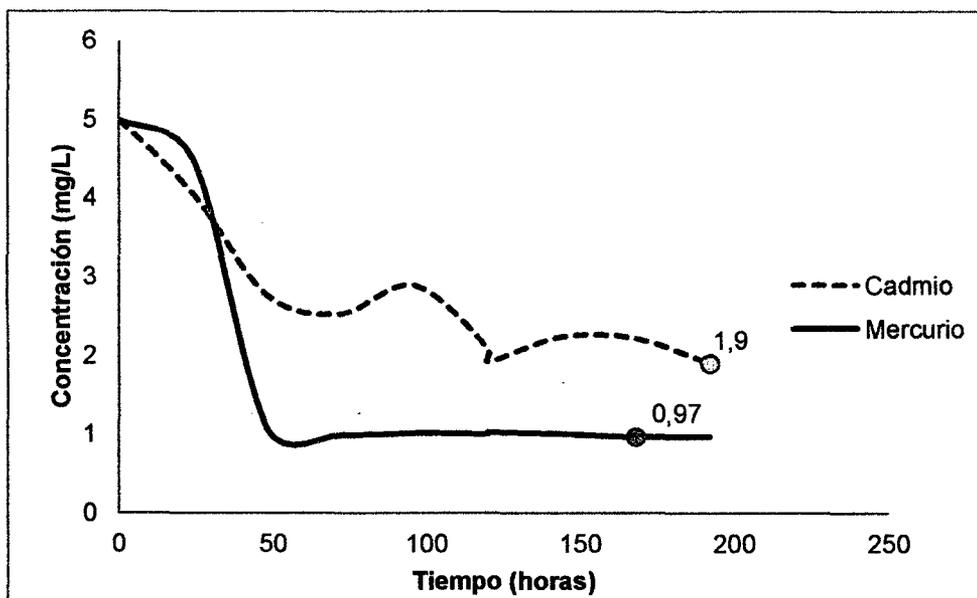


Figura 6.12: Curva de concentración (mg/L) de cadmio (II) y mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.

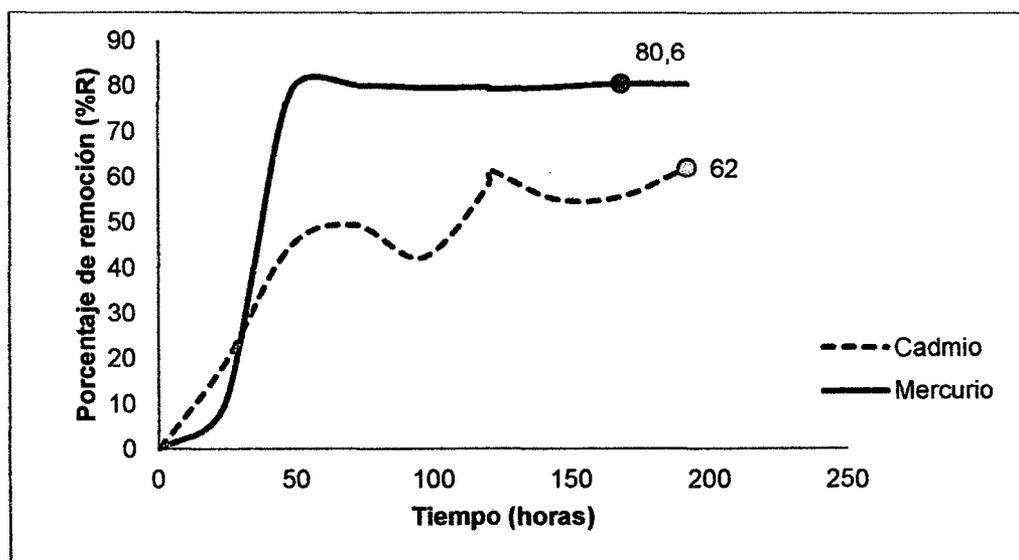


Figura 6.13: Curva de porcentaje de remoción (%R) de cadmio (II) y mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.

6.7.1 Determinación de cadmio (II) en solución residual de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Luego de ser digestadas y enrasadas a un volumen final de 50 mL con agua ultrapura, se procedió a la lectura de la concentración de cadmio (II) en las muestras con el equipo de ICP-OES para el cadmio (II) obteniendo los siguientes resultados mostrados en el cuadro 6.13 para cada solución analizada.

Cuadro 6.13 : Concentración de cadmio (II) que se obtiene en las soluciones residuales

Identificación de las muestras SR=Solución residual	Volumen final de la alicuota (mL)	Lectura de cadmio $\lambda=228,8$ nm LD=0,01 mg/L (mg/L)
M-1-D-Cd(SR)	50,00	3,14
M-2-D-Cd(SR)	50,00	1,86
M-3-D-Cd(SR)	50,00	1,83
M-4-D-Cd(SR)	50,00	2,41
M-5-D-Cd(SR)	50,00	2,47
M-6-D-Cd(SR)	50,00	3,47
M-7-D-Cd(SR)	50,00	3,19
M-8-D-Cd(SR)	50,00	3,39
M-8-D-Dup-Cd (SR)	50,00	3,42
BK	50,00	0,00

En el cuadro 6.14 se muestran los resultados del porcentaje de remoción (%R) de cadmio (II) para cada solución residual analizada. El porcentaje de remoción se calculó empleando la ecuación (2) y tomando los datos del cuadro 6,14. El máximo porcentaje de remoción para el cadmio (II) es de 63,4 % y corresponde a la muestra tomada después del tercer día.

Cuadro 6.14: Resultados del porcentaje de remoción (%R) de cadmio (II) en cada solución residual Analizada

Metal en estudio	Identificación de la muestra	Concentración inicial la solución (Co) (mg/L)	Concentración final obtenida (Ci) (mg/L)	Porcentaje de remoción del metal $\%R = \frac{Co - Ci}{Co} \times 100$
Cadmio (II)	M-1-D-Cd(SR)	5	3,14	37,2
	M-2-D-Cd(SR)	5	1,86	62,8
	M-3-D-Cd(SR)	5	1,83	63,4
	M-4-D-Cd(SR)	5	2,41	51,8
	M-5-D-Cd(SR)	5	2,47	50,6
	M-6-D-Cd(SR)	5	3,47	30,6
	M-7-D-Cd(SR)	5	3,19	36,2
	M-8-D-Cd(SR)	5	3,39	32,2
	M-8-D-Dup-Cd (SR)	5	3,42	31,6
	BK	0	0	0

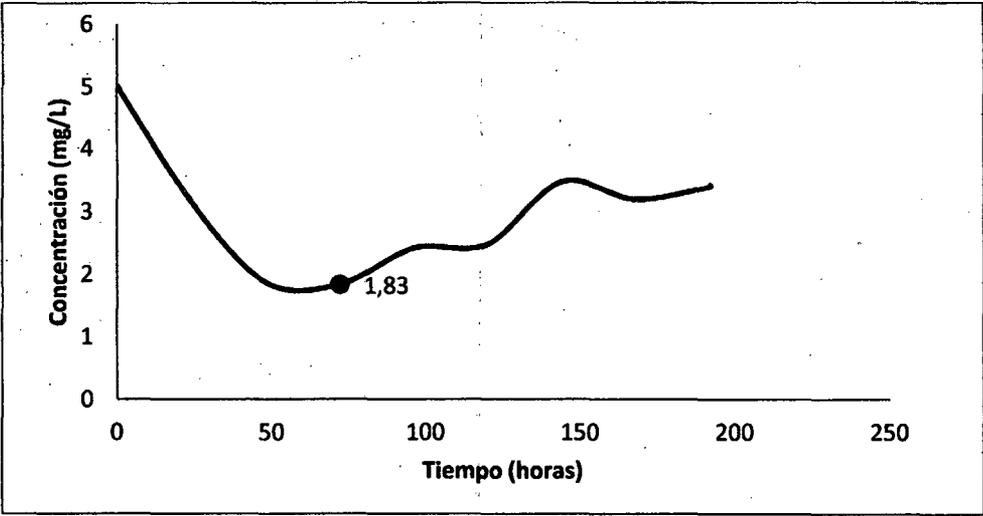


Figura 6.14: Curva de concentración (mg/L) de cadmio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.

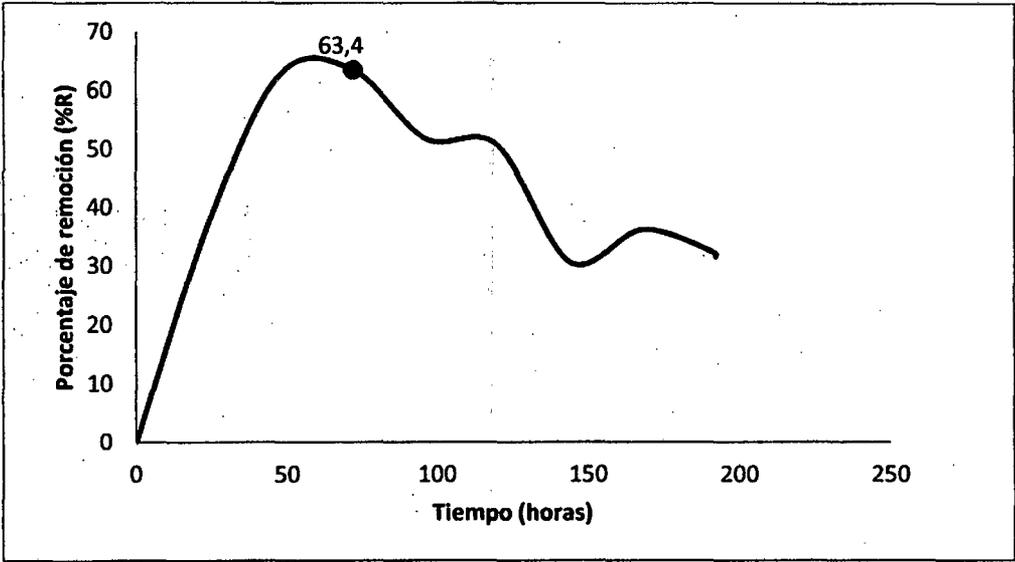


Figura 6.15: Curva de porcentaje de remoción (% R) de cadmio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.

En la figura 6.14, se muestra una curva de concentración (mg/L) de cadmio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada, destacando el pico más bajo de 1,83 mg/L. Este pico representa la máxima absorción del Jacinto de agua, es por eso que en la figura 6.15, se muestra el máximo pico de porcentaje de remoción para un tiempo por 72 horas (63,4 %).

6.7.2 Determinación de mercurio (II) en solución residual de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Luego de ser digeridas y enrasadas a un volumen final de 50 mL con agua ultrapura, se procedió a la lectura de estas muestras con el equipo de absorción atómica acoplado a un generador de hidruros (vapor frío) obteniendo los siguientes resultados mostrados en el cuadro 6,15 para cada solución analizada.

Cuadro 6.15: Concentración de mercurio (II) que se obtiene en las soluciones residuales

Identificación de las muestras SR=Solución residual	Volumen final de la alícuota (mL)	Lectura de mercurio $\lambda=253,65$ nm LD=0,00005 mg/L (mg/L)
M-1-D-Hg(SR)	50	1,29
M-2-D-Hg(SR)	50	0,51
M-3-D-Hg(SR)	50	0,55
M-4-D-Hg(SR)	50	1,24
M-5-D-Hg(SR)	50	0,43
M-6-D-Hg(SR)	50	0,57
M-7-D-Hg(SR)	50	0,66
M-8-D-Hg(SR)	50	0,41
M-8-D-Dup-Hg(SR)	50	0,46
BK	50	0,00

En el cuadro 6.16 se muestran los resultados del porcentaje de remoción (% R) de mercurio para cada solución residual analizada. El porcentaje de remoción se calculó empleando la ecuación (2) y tomando los datos del cuadro 6.15. El máximo porcentaje de remoción para el mercurio (II) es 91,8 % y corresponde a la muestra tomada después del octavo día.

Cuadro 6.16: Resultados del porcentaje de remoción (%R) de mercurio (II) en cada solución residual analizada

Metal en estudio	Identificación de la muestra	Concentración inicial la solución (Co) (mg/L)	Concentración final obtenida (Ci) (mg/L)	Porcentaje de remoción del metal $\%R = \frac{Co - Ci}{Co} \times 100$
Mercurio (II)	M-1-D-Hg(SR)	5	1,29	74,2
	M-2-D-Hg(SR)	5	0,51	89,8
	M-3-D-Hg(SR)	5	0,55	89
	M-4-D-Hg(SR)	5	1,24	75,2
	M-5-D-Hg(SR)	5	0,41	91,4
	M-6-D-Hg(SR)	5	0,57	88,6
	M-7-D-Hg(SR)	5	0,66	86,8
	M-8-D-Hg(SR)	5	0,41	91,8
	M-8-D-Dup-Hg(SR)	5	0,46	90,8
	BK	0	0	0

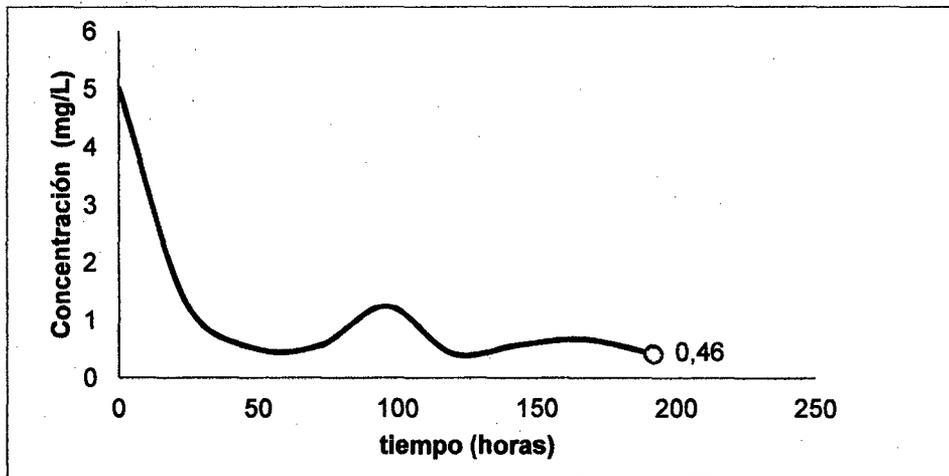


Figura 6.16: Curva de concentración (mg/L) de mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.

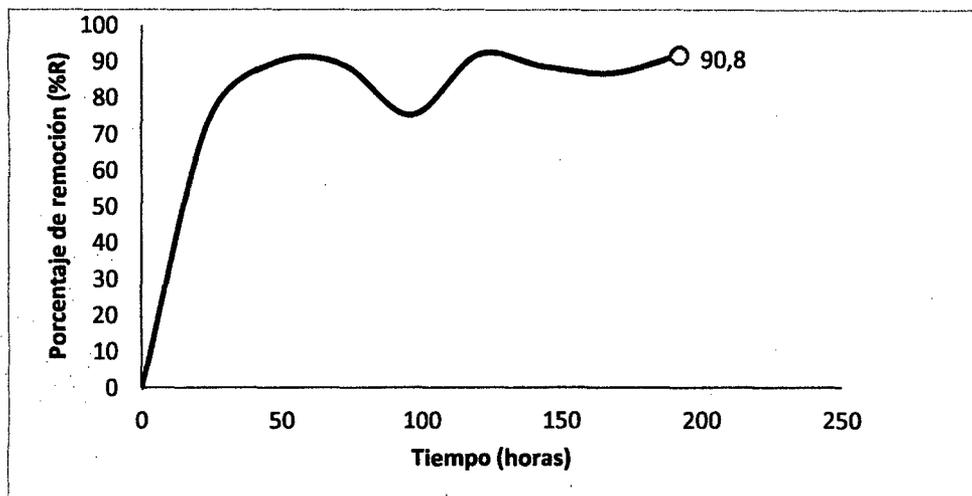


Figura 6.17: Curva de porcentaje de remoción (%R) de mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada.

En la figura 6.16, se muestra una curva de concentración (mg/L) de mercurio (II) en función del tiempo en horas para cada solución residual analizada, destacando el pico más bajo de 0,46 mg/L. Este pico representa la máxima absorción del Jacinto de agua, es por eso que en la figura 6.17 se muestra el máximo pico de porcentaje de remoción (90,8 %), para un tiempo de 192 horas (8 días).

6.8 Determinación de cadmio (II) y mercurio (II) en las raíz, tallo y hojas para una muestra de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua)

Se pesaron 5 gramos de muestra húmeda de raíz, tallo y hojas de las muestras, M-7-D(P) para el cadmio (II) y M-4-D(P) para el mercurio (II) como se muestra en el cuadro 5.16, los cuales fueron digeridos y la fracción resultante enrasada a un volumen de 50 mL en digitubo con agua ultrapura. Las lecturas de la concentración de Cd (II) y Hg (II) expresadas en mg/L, mg/kg y en porcentaje para cada parte de la planta se muestran en el cuadro 6.17.

En el cuadro 6.17, se aprecia que la máxima absorción de la planta se da en la zona de la raíz tanto para el cadmio (II) como para el mercurio (II).

El mecanismo de absorción del metal favorecido por los microorganismos que se forman alrededor de las raíces, facilitan la absorción del cadmio y mercurio en mayor porcentaje que en los tejidos celulares de los tallos y hojas, por ello se explica los resultados del cuadro 6.17.

Cuadro 6.17: Lecturas de la concentraciones en mg/L y mg/kg de las alícuotas tomadas de cadmio (II) y mercurio (II) para cada muestra analizada

Identificación de las muestras P=Planta	Zona de cada planta analizada	Volumen final de la alícuota (mL)	Lectura (mg/L)	Concentración (mg/kg)	Porcentaje %
M-7-D-Cd(P)	RAIZ	50	11,13	109,47	71,70
	TALLO	50	1,34	13,05	8,55
	HOJAS	50	3,07	30,16	19,75
M-4-D- Hg(P)	RAIZ	50	9,72	95,75	74,20
	TALLO	50	1,01	10,02	7,76
	HOJAS	50	2,33	23,28	18,04

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

- ✓ Se lograron determinar las condiciones óptimas para obtener una sorción cuantitativa de Cd (II) y Hg (II) con *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), siendo los resultados obtenidos, favorables para determinar la sorción de estos iones metálicos en diferentes réplicas de Jacinto de agua recolectados desde el primer día hasta el octavo día y demostrando así la efectividad de la técnica de fitorremediación.
- ✓ La dosis óptima de los nutrientes fue de 1 mL de la solución A y 0,5 mL de la solución B, manteniendo la planta viva por más de 25 días, tiempo suficientemente óptimo para desarrollar nuestra investigación.
- ✓ El pH óptimo para el cual la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) se mantuvo viva por más de 18 días sometida en una solución de 1 mg/L de cadmio (II) y análogamente por más de 20 días para una solución de 1 ppm de mercurio (II), siendo el resultado para ambos ensayos un pH óptimo 5 para el cual no presentan precipitación de nutrientes o de los mismos iones metálicos.
- ✓ La concentración óptima del metal para la viabilidad de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), es de 5 mg/L tanto para el cadmio (II) y mercurio (II) para los cuales se mantuvo viva la planta por 15 días para el cadmio (II) y 14 días para el mercurio (II), luego de ser sometidas a esa concentración para cada metal
- ✓ La máxima concentración de cadmio (II) y mercurio (II) obtenida de las muestras de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) luego de ser sometidas a una mezcla de 5 mg/L de cadmio (II) y mercurio (II), fueron de 165,47 mg/kg para el cadmio (II) mientras que para el mercurio (II) se obtuvo 155,87 mg/kg, luego de un periodo de 7 días.
- ✓ Los porcentajes de sorción de cadmio (II) y mercurio (II) en *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) luego de ser sometidas a una mezcla de 5 mg/L de ambos metales fueron 16,56 % para el cadmio (II) y 15,6 % para el mercurio (II) ambos para un periodo de 7 días.
- ✓ La concentración de cadmio (II) y mercurio (II), presentes en las soluciones residuales tratadas previamente con *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), fueron de 1,90 mg/L para el cadmio (II) para un periodo de 8 días y 0,97 mg/L para el mercurio (II) en un periodo de 7 días. Los resultados reflejan la máxima absorción de cadmio (II) y mercurio (II), respectivamente.

- ✓ Finalmente, el porcentaje de remoción de cadmio (II) y mercurio (II) en las soluciones a las que fue sometida la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) fue de 62 % de máxima remoción para el cadmio (II) en 8 días y 80,6 % de máxima remoción para en mercurio (II) en 7 días.

- ✓ Por lo tanto, la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) es una planta potencialmente aprovechable para remover cadmio (II) y mercurio (II) en aguas contaminadas, dándole las condiciones óptimas para realizar el proceso se obtienen resultados favorables para la remoción de estos iones metálicos estudiados.

CAPÍTULO VIII

RECOMENDACIONES

8 RECOMENDACIONES

- ✓ Aplicar un sistema de remoción de parámetros nitrogenados y fosforados en aguas residuales domésticas con *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) y comprobar su eficacia en la remoción de estos parámetros.
- ✓ Se sugiere la aplicación de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) para la remoción de metales como el plomo, arsénico y selenio presentes en aguas residuales industriales.
- ✓ Diseñar un sistema de eliminación de la biomasa de *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) contaminada con cadmio (II) y mercurio (II) luego de haber removido estos contaminables.
- ✓ Aplicar la técnica de fitorremediación de cadmio (II) y mercurio (II) en aguas contaminadas con estos metales empleando otras especies diferentes a *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) para comparar su efectividad en la remoción de estos iones metálicos.
- ✓ Estudio de la concentración de metalotioneínas y fitoquelatinas en diferentes etapas de la sorción, metabolismo y detoxificación de Cd (II) y Hg (II).
- ✓ Aplicar el método a muestras reales y acondicionarle un método secundario para la remoción total de los metales.

CAPÍTULO IX
REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Wilson JR, Holst N, Rees M. (2005). Determinantes y los patrones de crecimiento de la población en Jacinto de agua. *Aquat Bot*, 81,51-67.
- [2]. Heard TA, Winterton SL. (2000). Las interacciones entre el estado nutricional y el picudo herbivoría en el control biológico del jacinto de agua. *J.Appl.Ecol* 37,117-127.
- [3]. Olivares E, G. Colonnello (2000). Gradiente de salinidad en el río Mánamo, una distribución represado de Delta Orinoco, y su influencia en la presencia de *Eichhornia crassipes* *Paspalum repens*. *Interciencia* 25,242-248.
- [4]. Harris RC, Rudd JW, Amyot M, Babiarz CL, Beaty KG, Blanchfield PJ, Bodaly RA, Branfireun BA, Gilmour CC, Graydon JA, Heyes A, Hintelmann H, Hurley JP, Kelly CA, Krabbenhoft DP, Lindberg SE, Mason RP, Paterson MJ, Podemski CL, Robinson A, Sandilands KA, Southworth GR, St Louis VL, Tate MG (2007). Whole-ecosystem study shows rapid fish-mercury response to changes in mercury deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104,16586-16591.
- [5]. Nielsen JB. (1992). Toxicokinetics of mercuric chloride and methylmercuric chloride in mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, 37,85-122.
- [6]. Mahesh W. Jayaweera, Jagath C. Kasturiarachchi, Ranil K.A. Kularatne, Suren L.J. Wijeyekoon (2008). Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands. *Journal of Environmental management*, 87(3),450-460.
- [7]. Foluso O. Agunbiade A, Bamidele I. Olu-Owolabi, Kayode O. Adebowale (2009). Phytoremediation potential of *Eichhornia crassipes* in metal-contaminated coastal water. *Bioresource Technology journal*, 100,4521-4526.
- [8]. Virendra Kumar Mishra, BD Tripathi (2009). Accumulation of chromium and zinc from aqueous solutions using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Journal of Hazardous Materials*, 164,1059-1063.
- [9]. M. Azizur Rahman, H. Hasegawa (2011). Aquatic arsenic: Phytoremediation using floating macrophytes *Chemosphere*, 83, 633-646.
- [10]. Mallick N. (2003), Biotechnological potential of *Chlorella vulgaris* for accumulation of Co and Ni from single and metal solution. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19,695-701.
- [11]. De Olivera L. (2004), Heavy metal biosorption by chitin and chitosin isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology*, 35,243-247.

- [12]. Audet P., Charest C. (2007) Heavy metal phytoremediation from a metal-analytical perspective, 147(1),231–237.
- [13]. Kramer U. (2005) Phytoremediation: Novel approaches to cleaning up polluted soils current opinions in Biotechnology,16,133-141.
- [14]. Melcer R., Post L. (2004) Merging genes could create plants that clean contaminated ground. *From green to clean*.
- [15]. Le Duc D., Terry N. (2005) Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *Journal Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32: p.514-520.
- [16]. Robinson B., Schulin R., Nowack B., Roulier S., Menon M., Clothier B., Green S., Mills T. (2006). Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated site. *Snow Landsc. Res.*,80,221-234.
- [17]. Jing Y., He Z., Yang X. (2007) Role rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated oil. *Journal Zhejiang Univ. Sci. B.*, 8,192-207.
- [18]. Hazrat Ali, Ezzat Khan, Muhammad Anwar Sajad (2013).Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. *Chemosphere*,91.869-881.
- [19]. Polprasert C. (1996), *Organic waste recycling, technology and management*, 2a edición, Wiley. Ontario, Canadá, 412.
- [20]. Brooks R. R. (editor) (1998), "Plants that hyperaccumulate heavy metals", *CAB International*, Cambridge, USA.
- [21]. Raskin I. y B. D. Ensley (2000).*Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*, Wiley y Sons.
- [22]. Pedraza,G.(2000).Análisis económico ambiental de la aplicación de sistemas de descontaminación productiva en la microcuenca los sainos frente a las políticas de cobro de la corporación autónoma.
- [23]. Sanità di Toppi, L., Gabrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*,41,105-130.
- [24]. Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*,17,21-34.

- [25]. Poschenrieder C., Gunsé, B., Barceló, J. (1989). Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiology*,90,1365-1371.
- [26]. Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A. (2001). Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52, 2115-2126.
- [27]. Singh, P.K., Tewari, R.K. (2003). Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of Brassica juncea L. plants. *Journal of Environmental Biology*,24,107-112.
- [28]. Gouia, H., Ghorbal, M.H., Meyer, C. (2000). Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiology and Biochemistry*,38,629-638.
- [29]. Goldbol, D.L., Hutterman, A. (1985). Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation on *Picea abies* (Karst.) seedlings and the significance of these metals to forest die-back. *Environmental Pollutio*. 38,375-381.
- [30]. Astolfi, S., Zuchi, S., Passera, C. (2005). Effect of cadmium on H(+)-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Science*, 169,361-368.
- [31]. Fodor, A., Szabó-Nagy, A., Erdei, L. (1995). The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *Journal of Plant Physiology*,14,787-792.
- [32]. Ali, G., Srivastava, P.S., Iqbal M. (2000). Influence of cadmium and zinc on growth and photosynthesis of *Bacopa monniera* cultivated in vitro. *Biologia Plantarum*,43,599-601.
- [33]. Maksymiec, W., Wojcik, M., Krupa, Z. (2007). Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere*,66,421-427.
- [34]. Stohs, S.J., Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*,18,321-336.
- [35]. Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitão, M., Okamoto, O.K., Morse, D., Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*,39,1008-1018.
- [36]. Lozano-Rodríguez, E, Hernández, L.E., Bonay, P., Cárpena-Ruiz, R.O. (1997) Distribution of Cd in shoot, and root tissues of maize and pea plants: physiological distribution. *Journal of Experimental Botany*, 48,123-128.

- [37]. Balestrasse KB, Gallego SM, Tomaro ML (2004). Cadmium induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max. L.*) plants. *Plant. Soil*, 262,373-381.
- [38]. Romero-Puertas, M.C. (2004). *Metabolismo de especies de oxígeno reactivo en plantas de guisante (Pisum sativum L.) y en peroxisomas de hojas en condiciones de estrés por cadmio*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada. España.
- [39]. Olmos, E., Martínez-Solano, J.R., Piqueras, A., Hellin, E. (2003). Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *Journal of Experimental Botany*,54,291-301.
- [40]. Garnier, L., Simon-Plas, F., Thuleau, P., Agnel, JP., Blein, JP., Ranjeva, R., Montillet, JL. (2006). Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant Cell and Environment*,29,1956-1969.
- [41]. Del Río, L.A., Corpas, F.J., Barroso, J.B. (2004). Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry*, 65,783-792.
- [42]. Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gómez, M., del Río, L.A., Sandalio, L.M.(2006). Cadmium effect on the oxidative metabolism of pea roots. Imaging of ROS and NO production in vivo. *Plant Cell and Environment* ,29,1532-1544.
- [43]. Pinto, A.P., Mota, A.M., De Varennes, A., Pinto, F.C. (2004). Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Science of the total environment*, 326,p.239-274.
- [44]. McLaughlin, M.J., Singh, B.R. (1999). *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.
- [45]. Aguilar, J., Dorronsoro, C., Bellver, R., Fernández, E., Fernández, J., García, I., Iriarte, A., Martín, F., Ortiz, I., Simón, M. (2003). Contaminación de los suelos tras el vertido tóxico de Aznalcóllar. Universidad de Granada-Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. España.
- [46]. Usepa. (United states environmental protection agency). (2005). Mercury in medical facilities. [citado 22 julio 2005].(<http://www.epa.gov/seahome/mercury/src/terms.htm>).
- [47]. UNEP (United Nations Environment Programme) (2002). Global Mercury Assessment Report, Geneva. . [citado 11 octubre 2000].([http:// http://www.chem.unep.ch/mercury](http://http://www.chem.unep.ch/mercury)).
- [48]. Lytle C. M., F. W. Lytle, N. Yang, J. H. Qian, D. Hansen, A. Sayed, y N. Terry (1998), "Reduction of Cr(VI) to Cr (III) by wetland plants; potential for In situ metal detoxification", *Environmental Science and Technology*, 32,3087-3093.

- [49]. Chapman, H. A. ; Riese, R. J.; Shi, G. P.(1997), Emerging roles for cysteine proteases in human biology.59,63-68.
- [50]. Makarova, K. S.; Aravind, L.; E. V.(2000), *Trends in Biochemical Sciences* , 25(2),50-52.
- [51]. Wu, G.; Fang.Y. Z.; Yang, S.;Lupton, J.R.(2004) Turner, N. D. , *The Journal of Nutrition*, 134(3),489-492.
- [52]. Cobbett C. S. (2000), "Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification", *Plant Physiology*, 23,825-832.
- [53]. Moreno-Sanchez R. Devars S. 1999 pesados en la biosfera. En: contaminación ambiental por metales pesados : Impacto en los seres vivos. A. G. T. Editor, S.A.
- [54]. Rauser,W.E.(1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophysical*, 31,19-48.
- [55]. Suresh B. and Ravishankar G. A. (2004). Phytoremediation-A Novel and promising Approach for Enviromental Clean-up. *Critical Reviews in Biotechnology*, 24(2-3),97-124.
- [56]. Núñez, R. A., Meas V. Y., Ortega R. y Olguín, E.J. 2004. Fitorremediación fundamentos y aplicaciones. *Ciencia. Revista de la Academia mexicana de ciencias*, 55, 69-82.
- [57]. Wagner, G.J.(1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agron*, 51,173-212.
- [58]. Godbold, D.L.; Horst, W.J.; Collins, J.C.; Thurman, D.A.; Marschner, H.(1984). Accumulation of zinc and organic acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *deschampsia caespitosa*. *J. Plant Physiol*, 116,59-69.
- [59]. Mathys, W.(1997) The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc-resistance in herbage plants. *Physiol. Plant*, 40,130-136.
- [60]. S.K. Yadav (2009). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants, *South African Journal of Botany* 76,167 179.
- [61]. Salt, D. E., M. Blaylock, N. P. B. A. Kumar, V. Dushenkov, I. Chet and I. Raskin (1995). Phytoremediation: a noval strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*,13,468-474.

- [62]. Gekeler W. Grill E. Winnacker EL. Zenk MH. 1988. Algae sequester heavy metals via phytochelatin complexes. *Arch Microbiol* 150: 197-202.
- [63]. Verma SK. Singh SP. 1995. Multiple metal resistance in Cyanobacteria *Nostoc muscorum*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 54, 614-619.
- [64]. Sandau E. Sandau P. Pulz O. Zimmermann M.(1996). Heavy metal sorption algae and algae byproducts. *Acta Biotechnol*,16,103-119.
- [65]. Markert. B. (1992). Multi-element analysis in plant material analytical tools and biological question. In: Adriano. D.C. Biogeochemistry of trace Metals. Boca Raton. FL., 402-428.
- [66]. Mac Farlane. G. R., and Burchett, M. D. (2002). Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) *Vierth Mar environ res.*,54(1),5-84.
- [67]. Yang, X.; Feng, Y.; He, Z.; Stoffella, P.J.(2005).Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*,18, 339-353.
- [68]. vögeli-lange, r.; wagner, G.J.(1990).Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiol*, 92,1086-1093.
- [69]. Ortiz, D.F.; Ruscitti, T.; Mc Cue, K.; Ow, D.W.(1995).Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-Type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.*, 270,4721-4728.
- [70]. Salt, D.E.; Rauser, W.E.(1995) Mg ATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.*,107,1293-1301.
- [71]. Krotz, R.M.; Evangelou, B.P.; Wagner, G.J.(1989). Relationships between cadmium, zinc, Cd. binding peptide, and organic acid in tobacco suspension cells. *Plant Physiol.*, 91,780-787.
- [72]. Tong, Y.P.; Kneer, R.; Zhu, Y.G.(2004). Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science*, 9,7-9.
- [73]. Krämer, U.; Pickering, I.J.; Prince, R.C.; Raskin, I.; Salt, D.E.(2000) Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiol*, 122,1343-1354.
- [74]. Persans, M.W. et al. (2001). Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98,9995-10000.
- [75]. Salt, D.E.; Wagner, G.J.(1993).Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. *J. Biol. Chem.*,268,12297-12302.

- [76]. McIntyre T.(2003). Phytoremediation of heavy metals from soils, *Adv. Biochem. Eng./Biotech.* 78, 97-123.
- [77]. Universidad Nacional Agraria la Molina.(1994).Centro de Investigación de Hidroponía y Nutrición Mineral.[revisado el 15 de julio 2012] Obtenido de <http://www.lamolina.edu.pe/hidroponia/solucion1.htm>.
- [78]. Standard Methods for the examination of water and wastewater APHA-AWWA-WEF. Ed 21 st Edition.
- [79]. Blanco D., Llanos B., Cuizano NA., Maldonado H y Navarro AE. (2005). Optimización de la Adsorción de Cadmio divalente en *Lessonia trabeculata* mediante reticulación de CaCl₂. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 71,237-245.
- [80]. Navarro AE., Ramos KP., Campos K. y Maldonado H. (2006A). Elucidación del Efecto del pH en la Adsorción de Metales pesados mediante Biopolímeros naturales: Cationes Divalentes Superficies Activas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7,(2)115-128.
- [81]. Pankit AN., Bhave SA. (2002). Cooper metabolic defects and liver disease: Environmental aspects. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*,17(3),403-407.
- [82]. Shiny KJ., Remani KN., Jalaja TK. y Sasidharan VK. (2004). Removal of Chromium by two aquatic pteridophytes. *Journal of Environmental Science and Engineering*, 46 (3),249-251.
- [83]. Clemens, S.(2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212,475- 486.
- [84]. Zenk, M.H.(1996). Heavy metal detoxification in higher plants—a review. *Gene*, 179, 21-30.
- [85]. Grill. E.; Winnacker, E.L.; Zenk, M.H.(1987) Phytochelatins, a class of heavy metal binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84, 439-443.
- [86]. Attila Jancsó, Béla Gyurcsik, Edit Mesterházy, Róbert Berkecz (2013), Competition of zinc (II) with cadmium (II) or mercury (II) in binding to a 12-mer peptide. *Journal of Inorganic Biochemistry*,126, 96-103.
- [87]. C. Cobbett, P. Goldsbrough (2002). *Annu. Rev. Plant. Biol.* 53,159–182.
- [88]. Vataniuk, O. K.; Mari, S.; Lu, Y. P.; Rea, P. A.(2000), *Journal of biological Chemistry*, 275(40), 31451-31459.
- [89]. Patra, M., Sharma, A.(2000). Mercury toxicity in plants. *Bot Rev*, 66,379-422.

- [90]. Nieboer, E., Richardson, D.H.S. (1980). The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ Pollut*, 1,3-26.
- [91]. Velasco-Alinsug, M.P., Rivero, G.C., Quibuyend, T.A.O. (2005). Isolation of mercury-binding peptides in vegetative parts of *Chromolaena odorata*. *Z Naturforsch*, 60, 252-259.
- [92]. Park, J., Song, W., Ko, D., Eom, Y., Hansen, T.H., Schiller, M., Lee, T.G., Martinoia, E., Lee, Y. (2012). The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *Plant J.*,69(2), 278-288.
- [93]. USEPA, 1991.Method 200.3 .Sample preparation procedure for spectrochemical tissues. Ed. William Mcdaniel.
- [94]. Violeta Muñoz (2013,marzo) Mecanismos de Fitorremediación. Recuperado de <http://colaboraonambien.blogspot.com/2013/03/mecanismos-de-fitorremediacion.html>.
- [95]. Antía Castedo (Junio, 2011). Sanidad recomienda a embarazadas y niños no comer atún rojo ni pez espada.[Revisado en 24 agosto del 2013]. Recuperado de <http://promocionintegraldelasalud.wordpress.com/tag/toxicidad-de-metales-pesados/>.
- [96]. Wood, J. (1974). Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science (Wash.D.C)*, 183,1049-1052.
- [97]. Vladimir Laber (Mayo-2013).Conferencia presidida por catedrático uruguayo en Ginebra.[Revisado en 20 julio del 2013] Recuperado de <http://labyrinthosocial.blogspot.com/2013/05/uruguay-natural-ya-no-sabemos-que-comer.html>.
- [98]. Paisio, C.E., González P.S., Talano, M.A. y Agostini, E.(2012). *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 3(2),119-146
- [99]. Justice, William S.; Bell, C. Ritchie; Lindsey, Anne H. (2005). *Wild Flowers of North Carolina* (2. printing. ed.). Chapel Hill, NC: Univ. of North Carolina Press.
- [100]. Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweeds.[Revisado el 15 de diciembre del 2013] Recuperado de <http://es.wikipedia.org/wiki/Lemna>.
- [101]. Cross, J.W. (2006). The Charms of Duckweed. [Revisado el 15 de diciembre del 2013] Recuperado de <http://es.wikipedia.org/wiki/Nenúfar>.

[102]. Catalogue of Life: 2007 Annual Checklist: The Integrated Taxonomic Information System. [Revisado el 16 de diciembre del 2013] Recuperado de http://es.wikipedia.org/wiki/Ceratophyllum_demersum.

[103]. Ngu TT, Stillman MJ. (2006). Arsenic binding to human metallothionein. *Journal of American Chemical Society*, 128,12473-12483.

[104]. Edhino HL (Octubre 2011). Fitorremediación: Fundamentos y aplicaciones. [Revisado el 10 de Octubre del 2012] Recuperado de <http://lcbie.univ-pau.fr/Gcabi/compounds/phytochelatins.htm>.

[105]. Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53,1-11.

ANEXOS

10, ANEXOS

1 Métodos estandarizados para tratamiento y análisis de muestras.

Para reducir la interferencia de la muestra orgánica y convertir el metal asociado a las partículas en una forma (normalmente el metal libre) que pueda determinarse por espectrometría de absorción atómica o espectrometría de plasma de acoplamiento inductivo, utilícese una de las técnicas de digestión señaladas más adelante. Utilícese el método de digestión menos complejos que permita y consistente, compatible con el método analítico y con el metal que se analiza.

1.1 Selección del ácido

El ácido nítrico digerirá la mayoría de muestras en forma adecuada (sección 3030E). El nitrato es una matriz aceptable tanto para la llama como para la absorción atómica electrotrémica y la matriz preferencial para ICP-MS. Algunas muestras pueden necesitar de adición de ácido perclórico, clorhídrico o sulfúrico para una digestión completa. Estos ácidos pueden interferir en el análisis de algunos metales y todos ellos proporcionan una matriz más pobre para análisis electrotrémico y ICP-MS. Confírmese la recuperación del metal para cada digestión y procedimiento analítico utilizado. Utilícese el cuadro A1 como una guía para determinar los ácidos que se pueden emplear (además de HNO_3) para llegar a una digestión completa. Por regla general, el HNO_3 solo es adecuado en el caso de muestras limpias o materiales que se oxiden con facilidad; la digestión con HNO_3 - H_2SO_4 o con HNO_3 - HCl es adecuada para materia orgánica fácilmente oxidables; en el caso de materia orgánica o minerales que contienen silicatos de difícil oxidación es necesario emplear HNO_3 - HClO_4 o HNO_3 - HF para la digestión. Si existen grandes cantidades de materia orgánica, es útil una combustión seca.

Cuadro A.1: Ácidos utilizados junto con HNO_3 para preparación de la muestra

Ácido	Recomendado para	Puede ser útil para	No recomendado para
HCl	-	Sb, Ru, Sn	Ag, Th, Pb
H_2SO_4	Ti	-	Ag, Pb, Ba
HClO_4	-	Materiales orgánicos	
HF	-	Materiales silicios	

1.2 Procedimiento de digestión

Dilúyase la muestra con concentraciones de Ag superiores a 1 mg/L hasta que su contenido sea inferior a 1 mg/L de Ag por los métodos de absorción atómica de llama y 25 µg/L o menor para análisis electrotérmica. Para problemas con la solubilidad del helero de plata en HNO₃, digéstese siguiendo el método 3030F,3b. Anótese la técnica de digestión empleada.

Las técnicas de digestión ácida generalmente rinden precisión de los tipos de muestra que son totalmente digeridos para la técnica. Debido a que los ácidos usados en la digestión añadirán metales a las muestras y blancos, minimizar el volumen de ácido usado.

Las técnicas de digestión con ácidos (sección 3030E-I) normalmente no son digestiones totales, el procedimiento de digestión del microondas (sección 3030K) puede ser usado como una alternativa. La digestión por microonda es recomendada para muestras analizadas por ICP-MS. El método de digestión por microondas es recomendado para los análisis de Ag, Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, y Zn. La digestión por microondas puede ser aceptada para análisis adicionales a condición de que su funcionamiento para estos elementos es validado.

Se sugieren volúmenes de muestras como lo indicado anteriormente para la espectrometría de absorción atómica de llama. Volúmenes menores, hasta un mínimo de 5 mL, son apropiados para horno de grafito, ICP y ICP-MS. No sub muestrear volúmenes menores a 5 ml, especialmente cuando las partículas están presentes. En cambio diluir las muestras con elevada concentraciones de analito después de la digestión. Si el volumen recomendado excede la capacidad de la vasija de digestión, añádase muestra al avanzar la evaporación, Para muestras que contienen partículas, las pipetas de orificio ancha puede ser útil para medir muestras y transferir.

Cuando las muestras se concentran durante la digestión (por ejemplo >100 mL de muestra empleada), determínese la recuperación de metal para cada matriz digerida, para verificar la validez del método. Empléese muestras grandes si requiere ácido adicional, por lo tanto también se incrementara la concentración de impurezas.

Cuadro A.2 : Concentraciones del metal en función de los volúmenes digeridos

Concentración estimada de metal mg/L	Volumen de muestra mL
<0,1	1000
0,1 – 10	100
10 – 100*	10

* Para espectrometría de absorción atómica de llama.

Anótese los resultados según la siguiente pautas:

$$\text{Concentración del metal, mg/L} = \frac{A \times B}{C}$$

Donde:

A = Concentración de metal en la solución digerida, mg/L

B = Volumen final de la solución digerida, mL, y

C = Volumen de la muestra, mL.

Prepárense muestras sólidas o lodos líquidos con elevados contenidos de sólidos, sobre una base ponderal. Mézclese la muestra y pásese una cantidad adecuada (normalmente 1 g de un lodo con 15 % de sólidos en total) a una vasija de digestión previamente pesada. Vuélvase a pesar y calcúlese el peso de la muestra. Sígase una de las técnicas de digestión que se dan a continuación. Sin embargo, este método de digestión es predominantemente para metales disueltos y extraíbles en muestras acuosas, otras pueden ser más apropiadas para muestras sólidas. Para completar la mineralización de las muestras sólidas, consúltese los métodos disponibles. Anótese los resultados de peso en húmedo con peso en seco, de la forma siguiente:

$$\text{Concentración del metal, mg/kg (peso húmedo)} = \frac{A \times B}{\text{g de muestra}}$$

$$\text{Concentración del metal, mg/kg (peso seco)} = \frac{A \times B \times 100}{\text{g de muestra} \times D} \times 100$$

Donde:

A = Concentración de metal en la solución digerida, mg/L

B = Volumen final de la solución digerida, mL y

D = Sólidos totales, %

Siempre prepárese un blanco para cada tipo de digestión realizada. Aunque siempre es mejor determinar todas las fuentes de contaminación, un reactivo blanco preparado con los mismos ácidos y sujetos a los mismos procedimientos de digestión como la muestra puede proporcionar la corrección de las impurezas presentes en los ácidos, en el agua para reactivos o en el material de vidrio.

2 Método para digestión por ácido nítrico (APHA 3030-E, 21ST ED, 2005) ^[78]

Para la amplia variación en niveles de concentración detectados por varias técnicas instrumentales y la necesidad de repartir adecuadamente con la fuente de contaminación en niveles de trazas, este método presenta un acercamiento para niveles analíticos altos (>0,1 mg/L) y otros para niveles de trazas ($\leq 0,1$ mg/L).

2.1 Digestión para absorción atómica de llama y niveles de concentraciones altas

2.1.1 Instrumental

- ✓ Placa caliente o hot plate.
- ✓ Matraces cónicos (erlenmeyer), de 125 mL o vasos Griffin de 150 mL, lavados con ácido y enjuagados con agua.
- ✓ Frascos volumétricos, 100 mL.
- ✓ Luna de reloj.

2.1.2 Reactivos

- ✓ Se usa ácido nítrico, HNO_3 conc, grado analítico o traza de metales.

2.1.3 Procedimiento

Use el equipo de protección listado en 3030 E.

Mézclase la muestra y pásese un volumen adecuado de la misma (100 mL es lo recomendado), la muestra preservada en ácido apropiado para las concentraciones de metales esperados para un frasco o vaso (véase sección 3030D por volumen de muestra). Añádase 5 mL de HNO_3 . Si se utiliza un vaso, cúbrase con una luna de reloj para minimizar la contaminación, astillas de ebullición, bolas de vidrio o gránulos de Hengar pueden ser utilizados para suavizar la ebullición y minimizar las salpicaduras cuando niveles de concentración altas (>10 mg/L) van a ser determinados. Lívese a ebullición lenta y evapórese sobre placa caliente hasta el menor volumen posible (aproximadamente 10 a 20 mL) antes de ocurrir una precipitación. Continúese calentando y añadiendo el HNO_3 conc, necesario para completar la digestión, perceptible porque la solución se hace transparente y ligeramente coloreada. No dejar que la muestra se seque durante la digestión.

Lávese las paredes del matraz o vaso y cubrir con luna de reloj (si lo utilizó) con agua libre de metales y luego filtre si es necesario (véase sección 3030B). Pásese el filtrado a un frasco volumétrico de 100 mL con dos partes de agua de 5 mL, añadiendo este líquido de enjuagado al matraz volumétrico. Enfríese, dilúyase hasta la señal y mézclase cuidadosamente. Tómese porciones de esta solución para las determinaciones del metal requerido.

3 Método Epa 200.3 (Digestión de metales en tejido por ICPOES/ICPOMS y absorción atómica) ^[93]

Este método está basado en el EPA method 200.3 sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements in biological tissues.

3.1 Alcance y Aplicación

Este método proporciona un procedimiento para la preparación de muestras de tejido biológico para la determinación de elementos totales recuperables. Este método es aplicable para los siguientes elementos: Al, Sb, As, Ba, Be, Bi, B, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Pb, Li, Mg, Mn, Mo, Ni, P, K, Se, Ag, Na, Sr, Tl, Sn, S, Ti, U, V, Zn.

3.2 Resumen del Método

Las muestras preparadas por este método pueden ser analizadas por espectrometría de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES), por espectroscopia de masas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

Una cantidad de muestra de tejido (animal, vegetal, pescado entre otros) es transferida a un digitube de 50 mL o a un erlenmeyer de 125 mL. El tejido es digerido con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno en un hotblock o plancha de calentamiento. De esta digestión se obtiene una solución clara, la cual puede ser analizada por métodos espectrométricos atómicos o de masas. La concentración de metal encontrada es reportada en microgramos por gramo ($\mu\text{g/g}$).

3.3 Definiciones

- ✓ **Metal total recuperable:** La concentración de analito determinado en una muestra sólida o en una muestra acuosa no filtrada luego de ser tratada por reflujo con un ácido mineral en caliente.
- ✓ **Blanco reactivo de laboratorio (BRL):** Una solución de reactivos la cual es tratada exactamente igual que la muestra, lo que incluye el contacto y la exposición a todo el material de vidrio y equipo usado en el tratamiento de la muestra. El BRL es usado para determinar si los analitos del método u otras interferencias están presentes en el ambiente del laboratorio, reactivos o instrumental de trabajo.

3.4 Interferencias y efecto matriz

La contaminación por Cromo de muestras biológicas se debe al uso de acero inoxidable (stainless steel). Se recomienda el uso de implementos de corte especiales y de disección hechos de materiales que no sean de nuestro interés. Cuchillos con hojas de titanio con mango de teflón podrían ser usados.

- ✓ En la preparación de la muestra, la contaminación es la principal preocupación. El área donde se realiza la preparación de la muestra, incluyendo la mesa de trabajo y la campana de extracción de gases, donde se digestan las muestras, deben ser periódicamente limpiados con el fin de eliminar la contaminación ambiental.
- ✓ La plata tiene baja solubilidad en la presencia de cloruros. La precipitación puede ocurrir si la concentración de plata es mayor a 0,1 mg/L en solución. Este problema es de interés principalmente para las muestras de tejidos marinos de moluscos. Un procedimiento de digestión alternativo puede ser necesario si la plata es un parámetro de interés.
- ✓ Las muestras con alto contenido de lípidos y grasas puede ser dificultosas de digerir completamente. No es inusual tener un poco de grasa residual sin digerir el extracto residual de este tipo de muestras.

3.5 Seguridad

- ✓ Todo el personal que manipula muestras ambientales debe poseer los implementos de seguridad adecuados para el desarrollo del ensayo. La manipulación de muestras orgánicas, en este caso de tejidos, puede implicar el contacto con organismos patógenos a la salud humana, razón por la cual el personal que realiza la preparación y digestión debe, después del ensayo, lavarse adecuadamente las manos y la cara con jabón antibacterial para evitar riesgos de infección y/o contagio de bacterias u otros organismos patógenos.
- ✓ Las hojas de "Datos de Seguridad", para todos los reactivos, tienen que estar disponibles y comprensibles para el personal; que desarrolle esta técnica, ácido nítrico y clorhídrico concentrados son moderadamente tóxicos y extremadamente irritantes de la piel y las membranas mucosas. El peróxido de hidrógeno es un reactivo fuertemente oxidante. Use siempre estos reactivos en una campana de extracción y en caso ocurra contacto de piel u ojos, lavar con abundante agua.
- ✓ Siempre use gafas de seguridad y guantes protectores cuando trabaje con estos reactivos.

3.6 Aparatos y equipos

3.6.1 Material de laboratorio

Para la determinación de niveles traza de elementos, la contaminación y las pérdidas son de especial importancia. Las fuentes de potencial contaminación incluyen el inadecuado lavado del material de laboratorio y la contaminación general del laboratorio producida, entre otros, por el polvo. Un área de trabajo limpia de laboratorio señalada para la manipulación de las muestras que presentan elementos en niveles traza debería ser utilizada. Los contenedores de las muestras pueden introducir errores positivos y negativos en la determinación de las trazas de elementos por contribución de contaminantes a través de la desorción/lixiviación de la superficie o agotamiento de las concentraciones de los elementos a través de los procesos de absorción que pueden estar presentes en la superficie. Todo el material de laboratorio reusable (vidrio, cuarzo, polietileno, teflón, etc.), incluyendo el contenedor de la muestra, deben ser lavados antes de usarse y demostrar que estén libres de contaminantes. El material de laboratorio debe ser remojado toda la noche y lavado con detergente grado laboratorio y agua, enjuagar con agua y remojar por 4 horas en una solución diluida de ácido nítrico, seguidamente enjuagar con agua, luego agua ASTM tipo I y dejar secar.

Nota: Solución sulfocromica no debe ser usada para el lavado de material de vidrio.

- ✓ Material de vidrio: Fiolas, erlenmeyers de 125 mL, lunas de reloj chupón.
- ✓ Material plástico: Digitubes de 50 mL, lunas de reloj.
- ✓ Pipetas calibradas, dispensadores de ácido y micropipetas calibradas.
- ✓ Frascos de plástico de 250 mL, 500 mL y 1000 mL.

3.6.2 Equipo de procesamiento de muestras

- ✓ Balanza analítica: Con división mínima de 0,1 mg.
- ✓ Plancha de calentamiento o hot block: Esta fuente de calefacción debe estar preparada para someter las muestras a digestión a una temperatura de 92 a 95 °C.

3.6.3 Equipo de disección de tejidos

- ✓ Tabla de disección: Debe estar compuesto de polietileno o de un material inerte no metálico, cuya superficie sea de fácil remoción y limpieza. Podría ser conveniente utilizar una lámina de plástico o de teflón.
- ✓ Cuchillas quirúrgicas: De acero inoxidable desechables con mango de acero inoxidable, madera o plástico.
- ✓ Bolsas de plástico con cierre hermético, libres de metal.
- ✓ Guantes de látex o de lavado, libres de talco.

3.6.4 Reactivos y materiales consumibles

- ✓ Los reactivos a usarse pueden contener impurezas elementales que pueden afectar los datos analíticos. El uso de reactivos grado p.a., asegura la calidad de resultados y minimiza, junto al empleo de blancos de digestión, el efecto de contaminantes en las lecturas obtenidas. Todos los ácidos usados para este método deben ser de grado p.a.
- ✓ Acido nítrico concentrado.
- ✓ Peróxido de hidrogeno ultrapuro al 30 %.
- ✓ Agua de calidad ASTM Tipo I.

3.6.5 Colección de muestras, preservación y almacenamiento

- ✓ Las muestras de tejidos deberían ser tomadas adecuadamente. Sería recomendable preparar como mínimo 50 g de muestra,
- ✓ En el caso de muestras de tejido animal, como tejidos de pescado (sea de mar o de río o laguna), carnes rojas (en sus diversas variedades: vacuno, equino, porcino, etc), carne de ave (sea pollo, codorniz, pavo, etc) entre otras la muestra será tratada directamente sin ser secada, igual situación será para tejidos vegetales carnosos (por ejemplo tubérculos, frutos carnosos, semillas, tallos, frutas, etc.), salvo que el cliente solicite los resultados en base seca. De ser así seguir de acuerdo a lo indicado en el siguiente párrafo. Si la disección del tejido, sea animal o vegetal, no puede ser realizada inmediatamente después de la recolección y toma de la muestra, se debería de colocar en una bolsa plástica de cierre hermético y pasarlo en un cooler o a un ambiente refrigerado, aproximadamente a 4 °C.
- ✓ En el caso de las muestras de tejido vegetal no camoso como las hojas, primeramente lavar las hojas con agua ultrapura, dejar secar al medio ambiente o llevar a secar en estufa por espacio de 12 horas a 24 horas a una temperatura menor a 50 °C. Una vez completamente secas las hojas, proceder a moler en mortero y tamizar por malla 20. En el caso de tejidos carnosos, el secado puede prolongarse a tiempos mayores de 48 a 36 horas.
- ✓ Si la disección del tejido, sea animal o vegetal, no puede ser realizada inmediatamente después de la recolección y toma de la muestra, se debería de colocar en una bolsa plástica de cierre hermético y pasarlo en un cooler o a un ambiente refrigerado, aproximadamente a 4 °C.
- ✓ Antes de la disección, el tejido debería ser enjuagado con agua ultrapura libre de metales y secado superficialmente. Se sugiere que la disección debería ser realizada antes de las 24 horas de colección de la muestra. Cada muestra individual de tejido debería también ser enjuagada con agua ultrapura libre de metales, secar superficialmente y refrigerar en nevera, de 0 °C a ≤-20 °C.

- ✓ En el caso de muestras de tejido vegetal, específicamente el caso de hojas, primeramente lavar las hojas con agua ultrapura, dejar secar al medio ambiente o llevar a secar en estufa por espacio de 12 horas a 24 horas a una temperatura menor a 50 °C. Una vez completamente secas las hojas, proceder a moler en mortero y tamizar por malla 20.
- ✓ Muestras de tejido de hasta 5 g, deberían ser preparadas usando implementos especiales y manipular con pinzas de plástico.
- ✓ El máximo tiempo de almacenamiento de las muestras diseccionadas de tejidos en la nevera es de una semana. Una vez descongelado, proceder a la digestión de la muestra. Evitar estar congelando y descongelando la muestra más de dos veces.
- ✓ En el caso de las muestras de hojas que han sido secadas, molidas y tamizadas, el tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente es de aproximadamente 30 días.
- ✓ ALS recomienda que el almacenamiento de los extractos de la muestra puedan ser almacenados a temperatura ambiente por un periodo máximo de 28 días.

3.7 Control de calidad

En los análisis de tejidos animal y vegetal se incorporaran los siguientes controles de calidad. Para que el reporte de resultados se emita, los controles de calidad deben de cumplir las tolerancias establecidas.

Los controles de calidad en el análisis de tejidos son los siguientes.

3.7.1 Blanco del método

Es un blanco el cual ha sido procesado de la misma manera que las muestras, tal y como lo describe la sección de preparación (véase sección 10). Este blanco controla el nivel de posible contaminación que puede adquirir la muestra durante el proceso de ensayo.

- ✓ Frecuencia: Dos blancos por cada lote.
- ✓ Limite de control: < Límite de Reporte (LR).

3.7.2 Blanco de tejido

Es una muestra de tejido animal o vegetal, el cual ha sido preparado, secado, molido, tamizado y almacenado para ser analizada en cada corrida analítica. Es una muestra de la cual se conoce las concentraciones de los elementos que la componen mediante pruebas realizadas en el laboratorio. Estos resultados obtenidos serán restados al blanco de tejido adicionado.

- ✓ Frecuencia: Uno por cada 20 muestras.

3.7.3 Duplicados de muestra

Los duplicados de muestra son dos o más alícuotas de una misma muestra preparadas y analizadas separadamente por el mismo método. Los duplicados son usados para monitorear la precisión del método.

- ✓ Frecuencia: Uno por cada 10 muestras.
- ✓ Límite de Control: 20 % de RSD

3.7.4 Material de referencia certificado

Material de referencia certificado es un material de referencia que posee valores certificados y técnicamente validados para determinados elementos. Este material de referencia certificado va acompañado de un certificado de análisis u otro documento certificado expedido por un organismo de acreditación. En las determinaciones de tejido animal, usaremos estándar certificado.

- ✓ Frecuencia: Uno por cada 20 muestras.
- ✓ Límite de Control: Recuperación comprendida entre el 80 a 120 %

3.7.5 Blanco de tejido adicionado

Un blanco de tejido adicionado es un blanco de tejido al cual se le ha adicionado una alícuota de estándar antes del proceso de digestión. Los resultados obtenidos son restados de los obtenidos del blanco de tejido. Este control tiene como objetivo controlar la recuperación de los elementos que no son controlados por el material de referencia certificado.

- ✓ Frecuencia: Igual que el blanco de tejido.
- ✓ Límite de Control : Recuperación de los analitos comprendida entre 75 a 125 %.

3.8 Procedimiento

3.8.1 Preparación de la muestra

- ✓ En el caso de muestras de tejido que han sido secadas y tamizadas, pesar 1 gramo de muestra en digitube o erlenmeyer de 125 mL. Para el caso de muestras de tejido que no han sido secadas, pesar hasta 5 gramos de muestra de tejido refrigerado en un erlenmeyer de vidrio de 125 mL o en un digitube de plástico de 50 mL. Para preparar el blanco de tejido adicionado, es adecuada la adición de estándar realizarlo en este paso, de tal manera que se permita el contacto de la muestra de tejido con la adición, esto previo a las adiciones del ácido respectivo.

3.8.2 Digestión de la muestra

- ✓ Agregar 10 mL de ácido nítrico concentrado a la muestra. Dejar reposar por espacio de 30 minutos a 1 hora mientras se va desarrollando la digestión en frío. Seguidamente, calentar la muestra en plancha de calentamiento o en un hotblock de 92 a 95 °C aproximadamente por 20 minutos, tiempo en el cual se generaran vapores pardos rojizos producto de los óxidos de nitrógeno originados por la oxidación de la materia orgánica.
- ✓ Agitar periódicamente la muestra, aun en caliente, verificando que la muestra no rebalse por la generación de vapores. En caso de generación de abundante espuma, retirar el digitube o frasco erlenmeyer de la fuente de calentamiento y dejar enfriar para que la espuma disminuya y no se corra el riesgo de que rebalse la muestra. Una vez fría y habiendo disminuido la espuma, proseguir con la digestión por el tiempo que resta.
- ✓ Trascurridos los 20 minutos de calentamiento totales en la plancha, retirar y dejar enfriar (en este paso, el tejido está casi disuelto). Una vez frío adicionar 5 mL de HNO_3 y llevar nuevamente al hotblock o plancha de calentamiento (agitando la muestra). Calentar por espacio de 20 minutos de 92 a 95 °C hasta generación de vapores pardos. Nuevamente retirar y dejar enfriar la muestra.
- ✓ Seguidamente adicionar 2 mL de HNO_3 y llevar a hotblock o plancha de calentamiento, dejando digerir por espacio de 2 horas.
- ✓ Transcurridas las dos horas dejar enfriar. Seguidamente adicionar 2 mL de H_2O_2 al 30 % y dejar digerir en frío por espacio de 10 minutos.
- ✓ Seguidamente llevar a plancha de calentamiento o hotblock, dejando digerir en caliente por espacio de 20 minutos. Agitar periódicamente y cerciorarse de que la muestra no genere demasiada espuma. Seguidamente dejar enfriar y adicionar nuevamente 2 mL de H_2O_2 , llevar al hotblock o plancha de calentamiento y dejar digiriendo por espacio de 20 minutos.

- ✓ Dejar enfriar y adicionar 2 mL de H₂O₂ al 30 % dejando digestar por dos horas, Enfriar, (la adición total de H₂O₂ es de 6 mL pero puede adicionarse hasta 10 mL, dependiendo de la naturaleza de la muestra).
- ✓ Llevar a volumen de 100 mL con agua ultrapura ASTM Tipo I, agitar y dejar sedimentar el material que no se ha disuelto y proceder a lectura.
- ✓ La muestra queda lista para la lectura: En el caso del ICP-OES la lectura se puede realizar de manera directa, mientras que para las lecturas en el ICP-MS, la muestra tiene que ser previamente diluida por 10.

3.8.3 Lectura de muestras

- ✓ Una vez que la muestra queda lista para la lectura se procede a leer de la siguiente manera:
En el caso que la muestra sea leída por la técnica del ICP-OES la lectura se puede realizar de manera directa.
- ✓ En el caso que la muestra sea leída por la técnica del ICP-MS la lectura tiene que ser previamente diluida por 10, aunque esta dilución podría ser de 5, dependiendo de la naturaleza de la muestra.

3.9 Cálculos y resultados finales

- ✓ Los límites de detección y reporte son analizados y determinados por los analistas. El supervisor de espectroscopia es el encargado de evaluar los datos obtenidos. Los límites de detección y reporte serán evaluados periódicamente. Esta periodicidad puede ser anual.
- ✓ Para determinar el valor del límite de detección del método, realizar la réplica de siete muestras de agua ultrapura, la cual ha pasado por el proceso de digestión del método. Calcular el límite de detección con la siguiente fórmula:

$$\text{LDM} = t \times S$$

Donde:

t = Valor de la t de student con un nivel de confianza del 99 % (t= 3,14 para 7)
replicas)

S = Desviación estándar de las 7 replicas.

- ✓ Para el cálculo de la concentración de una muestra húmeda, sea tejido animal o vegetal:

$$\text{Concentracion base húmeda} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\text{lectura}(\text{mg}) \times 0,1 \text{L} \times 1000 \text{ug/mg}}{\text{Peso de muestra húmeda}(\text{g})}$$

- ✓ Si queremos expresar esta concentración sobre base seca, sea tejido animal o vegetal, y la humedad se ha determinado de manera separada, el calculo será:

$$\text{Concentracion base seca} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\frac{\text{lectura}(\text{mg}) \times 0,1 \text{L} \times 1000 \text{ug}}{\text{mg} \times (100 - \% \text{humedad})}}{\text{Peso de muestra húmeda}(\text{g}) \times 100}$$

- ✓ Para el cálculo de la concentración de una muestra seca, sea tejido animal o vegetal:

$$\text{Concentracion} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\text{lectura}(\text{mg}) \times 0,1 \text{L} \times 1000 \text{ug/mg}}{\text{Peso de muestra seca}(\text{g})}$$

4: Método espectrométrico de absorción atómica de vapor frío (APHA 3112-B, 21ST ED, 2005) [78]

4.1 Discusión general

Este método es aplicable a la determinación de mercurio. Las practicas QC consideradas puede ser parte integral de cada método que puede ser encontrado en la sección 3020.

4.2 Instrumental

Cuando sea posible utilice material de vidrio exclusivo para análisis de Hg. Evite usar material de vidrio previamente expuestos a altos niveles de Hg tales como los usados en análisis de DQO, TKN o Cl⁻.

4.2.1 Espectrómetro de absorción atómica y equipo asociado

Los instrumentos y accesorios diseñados específicamente para medir el mercurio por la técnica de vapor frío pueden adquirirse en el mercado y pueden ser sustituidos.

4.2.2 Soporte de la celda

Sujétese la celda al cuerpo plano del quemador de óxido nítrico a otro soporte adecuado y alinéese con el haz luminoso para obtener el máximo de transmitancia.

4.2.3 Bombas de aire

Utilícese una bomba peristáltica con control electrónico de la velocidad capaz de suministrar 2 L de aire/min. También se puede utilizar cualquier otro sistema de aire comprimido regulado o cilindro de aire.

4.2.4 Flujómetro

Capaz de medir un flujo de aire de 2 L/min.

4.2.5 Tubos de aireación

Vidrio poroso recto con porosidad gruesa para utilizar el matraz de reacción.

4.2.6 Matraz de reacción

Matraz erlenmeyer de 250 mL o frasco para KOB, con tapón de caucho para sujetar el tubo de aireación.

4.2.7 Tubo desecador

De 150 mm x 18 mm de diámetro que contiene 20 g de $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Puede colocarse una bombilla de 60 W con una pantalla adecuada para evitar la condensación de humedad en el interior de la celda de absorción. Colóquese la bombilla de forma que se mantenga la temperatura de la celda 10 °C sobre la ambiental.

4.2.8 Tubos de conexión

Tubos de vidrio para transportar el vapor de mercurio desde el matraz de reacción a la celda de absorción y para interconectar los demás componentes. Los tubos de plástico vínlifico transparente pueden sustituirse por vidrio.

4.3 Reactivos

- ✓ **Agua libre de metales:** Agua ASTM tipo II.
- ✓ **Solución stock de mercurio:** Disolver 0,1354 g de HgCl_2 en 70 mL de agua, añade 1 mL de HNO_3 concentrado, y diluya a 100 mL con agua, 1,00 mL = 1,00 mg Hg.
- ✓ **Soluciones patrón de mercurio:** Prepárese una serie de soluciones patrón de mercurio con 0 a 5 $\mu\text{g/L}$ por dilución apropiada de la solución de mercurio de reserva con agua que contenga 10 mL de HNO_3 conc./L prepárense los patrones diariamente,
- ✓ **Acido nítrico :** HNO_3
- ✓ **Solución de permanganato potásico:** Disuélvanse 50 g de KMnO_4 en agua y dilúyase hasta 1 L.
- ✓ **Solución de persulfato potásico:** Disuélvanse 50 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en agua y dilúyase hasta 1 L.
- ✓ **Solución de cloruro de sodio-sulfato de hidroxilamina:** Disuélvanse 120 g de NaCl y 120 g de $(\text{NH}_2\text{OH})_2$, H_2SO_4 en agua y dilúyase hasta 1 L. El sulfato de hidroxilamina puede ser sustituido por soluciones al 10 % de clorhidrato de hidroxilamina.
- ✓ **Solución de estaño (Sn^{+2}):** Use cloruro de estaño (1) o sulfato de estaño (2); para preparar esta solución conteniendo una de 7,0 g $\text{Sn}^{+2}/100$ mL.
 - i. Disuelva 10 g SnCl_2 en agua que contenga 20 mL de HCl concentrado y diluya a 100 mL.
 - ii. Disuelva 11 g SnSO_4 en agua que contenga 7 mL de H_2SO_4 concentrado y diluya a 100 mL.

Ambas soluciones se descomponen con el tiempo. Se forma una suspensión, agitar continuamente el reactivo durante el uso. El volumen del reactivo es suficiente para procesar cerca de 20 muestras, ajustar los volúmenes preparados a el número de muestras procesadas.

✓ **Acido Sulfúrico:** H_2SO_4 .

4.4 Procedimiento

4.4.1 Operación del instrumento.

Llevar la longitud de onda a 253,7 nm. Instálese la célula de absorción y alinése con el trayecto luminoso para obtener la transmisión máxima. Conéctese el equipo asociado a la celda de absorción con los tubos de vidrio o de plástico de vinilo tal como se indica en la figura 3112:I. Conéctese el aire ajústese la velocidad de flujo a 2 L/min. Déjese que el aire fluya continuamente. Alternativamente síganse las indicaciones del fabricante para el funcionamiento.

Nota: La iluminación fluorescente puede aumentar los ruidos de la línea de base.

4.4.2 Estandarización

Transfíranse 100 mL de cada una de las soluciones patrón de Hg de 1,0; 2,0 y 5,0 $\mu\text{g/L}$ y un blanco de 100 mL de agua a matraces erlenmeyer de reacción de 250 mL. Añádanse 5 mL de H_2SO_4 y 2,5 mL de HNO_3 a cada matraz. Añádase 15 mL de solución de $KMnO_4$ a cada matraz y déjese reposar al menos 15 min. Añádanse 8 mL de solución de $K_2S_2O_8$ a cada matraz y caliéntese de 90-95 °C durante 2 horas a baño maría. Enfríese hasta temperatura ambiente. Se trata cada matraz individualmente añadiendo suficiente solución de NaCl-solución de hidroxilamina para reducir el exceso de $KMnO_4$, añadiéndose después 5 mL de solución de $SnCl_2$ o $SnSO_4$ y acoplado inmediatamente el matraz al dispositivo de aireación. Cuando el Hg se volatiliza y es arrastrado a la celda de absorción, la absorbancia aumenta al máximo en unos cuantos segundos. Tan pronto como el registrador vuelva aproximadamente a la línea de base quítese el tapón que sostiene el tubo poroso del matraz de reacción y reemplácese por un matraz con agua. Límpiase el sistema con una descarga de agua unos cuantos segundos y trabájese con el siguiente patrón de la misma manera. Constrúyase una curva estándar situando la altura de picos en relación con los microgramos Hg.

4.4.3 Análisis de muestras

Transfíranse 100 mL de muestra, o porción diluida hasta 100 mL, con un contenido no superior a 5,0 µg Hg/L, a un matraz de reacción. Trátase como en el apartado 4,4,4b. Aguas marinas, salmueras y fluidos de llenado con alto contenido en cloruros requieren hasta 25 mL más de solución de KMnO₄. Durante la etapa de oxidación, los cloruros se transforman en cloro libre, que se absorbe a 253 nm. Elimínese todo el cloro libre antes de reducir el Hg y efectúese un barrido del interior de la celda utilizando un exceso (25 mL) del reactivo hidroxilamina.

Elimínese el cloro libre introduciendo aire o nitrógeno tras la adición de la solución reductora de hidroxilamina. Utilícese un tubo aparte y vidrio poroso para evitar la acumulación de remanente de cloruro estañoso residual que podría dar lugar a reducción y pérdida de mercurio.

4.5 Cálculos

Determinese la altura de picos de la muestra a partir del gráfico registrador y léase el valor del mercurio en la curva estándar preparada según el apartado 4,4,4b.

4.6 Precisión y sesgo

En el siguiente cuadro se dan los datos de precisión y sesgo inter laboratorios para este método.

Cuadro A.3 : Precisión y sesgo inter laboratorios del método de espectrometría de absorción atómica de vapor frío para el mercurio

Forma	Conc µg/l	Desviación estándar (µg/l)	Desviación estándar relativa (%)	Error relativo (%)	Nº de participantes
Inorgánica	0,34	0,077	22,6	21,0	23
Inorgánica	4,2	0,56	13,3	14,4	21
Orgánica	4,2	0,36	8,6	8,4	21

Anexo 2. Estándares de calidad

1 Estándares nacionales de calidad ambiental para agua

Según el tipo de agua clasificada en categorías en las cuales se muestra los parámetros de metales pesados de los cuales el cadmio y mercurio son de nuestro interés como referencia. Estos datos fueron extraídos de la fuente de normas legales publicadas en el diario oficial "El peruano".

Tabla 1 : Estándares nacionales de calidad ambiental para agua categoría 1
(poblacional y recreacional)

Parámetro	Unidad	Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable			Aguas superficiales destinadas para recreación	
		A1	A2	A3	B1	B2
		Aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección	Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional	Aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzados	Contacto primario	Contacto Secundario
		Valor	Valor	Valor	Valor	Valor
Inorgánicos						
Aluminio	mg/L	0,2	0,2	0,2	0,2	**
Antimonio	mg/L	0,006	0,006	0,006	0,006	**
Arsénico	mg/L	0,01	0,01	0,05	0,01	**
Bario	mg/L	0,7	0,7	1	0,7	**
Berilio	mg/L	0,004	0,04	0,04	0,04	**
Boro	mg/L	0,5	0,5	0,75	0,5	**
Cadmio	mg/L	0,003	0,003	0,01	0,01	**
Cobre	mg/L	2	2	2	2	**
Cromo Total	mg/L	0,05	0,05	0,05	0,05	**
Cromo VI	mg/L	0,05	0,05	0,05	0,05	**
Hierro	mg/L	0,3	1	1	0,3	**
Manganeso	mg/L	0,1	0,	0,5	0,1	**
Mercurio	mg/L	0,001	0,002	0,002	0,001	**
Niquel	mg/L	0,02	0,025	0,025	0,02	**
Plata	mg/L	0,01	0,05	0,05	0,01	0,05
Plomo	mg/L	0,01	0,05	0,05	0,01	**
Selenio	mg/L	0,01	0,05	0,05	0,01	**
Uranio	mg/L	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Vanadio	mg/L	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Zinc	mg/L	3	5	5	3	**

** Se entenderá que para esta subcategoría, el parámetro no es relevante, salvo casos específicos que la autoridad competente determine.

Tabla 2 : Estándares nacionales de calidad ambiental para agua categoría 2
(actividades marino costeras)

Parámetro	Unidad	Agua de mar		
		Sub categoría 1	Sub categoría 2	Sub categoría 3
		Extracción y cultivo de moluscos bivalvos (C1)	Extracción y cultivo de otras especies hidrobiológicas (C2)	Otras actividades (C3)
INORGÁNICOS				
Amoniaco	mg/L	**	0,08	0,21
Arsénico Total	mg/L	0,05	0,05	0,05
Cadmio Total	mg/L	0,0093	0,0093	0,0093
Cobre total	mg/L	0,0031	0,05	0,05
Cromo VI	mg/L	0,05	0,05	0,05
Fosfatos (P-PO ₄)	mg/L	**	0,03-0,09	0,1
Mercurio Total	mg/L	0,0094	0,0001	0,0001
Níquel Total	mg/L	0,0082	0,1	0,1
Nitratos(N-NO ₃)	mg/L	**	0,07-0,28	0,3
Plomo Total	mg/L	0,0081	0,0081	0,0081
Silicatos (Si-SiO ₃)	mg/L	**	0,14-0,70	**
Zinc total	mg/L	0,081	0,081	0,081

** Se entenderá que para esta subcategoría, el parámetro no es relevante, salvo casos específicos que la autoridad competente determine.

Tabla 3 : Estándares nacionales de calidad ambiental para agua categoría 3 (riego de vegetales)

Parámetros para riego de vegetales de tallo bajo y tallo alto		
Parámetro	Unidad	Valor
Inorgánicos		
Aluminio	mg/L	5
Arsénico	mg/L	0,05
Bario total	mg/L	0,7
Boro	mg/L	0,5-6
Cadmio	mg/L	0,005
Cobalto	mg/L	0,05
Cobre	mg/L	0,2
Cromo VI	mg/L	0,1
Hierro	mg/L	1
Litio	mg/L	2,5
Magnesio	mg/L	150
Manganeso	mg/L	0,2
Mercurio	mg/L	0,001
Niquel	mg/L	0,2
Plata	mg/L	0,05
Plomo	mg/L	0,05
Selenio	mg/L	0,05
Zinc	mg/L	2

Tabla 4 : Estándares nacionales de calidad ambiental para agua categoría 3 (bebidas de animales)

Parámetros para bebida de animales		
Parámetro	Unidad	Valor
Inorgánicos		
Aluminio	mg/L	5
Arsénico	mg/L	0,1
Berilio	mg/L	0,1
Boro	mg/L	5
Cadmio	mg/L	0,01
Cobalto	mg/L	1
Cobre	mg/L	0,5
Cromo VI	mg/L	1
Hierro	mg/L	1
Litio	mg/L	2,5
Magnesio	mg/L	150
Manganeso	mg/L	0,2
Mercurio	mg/L	0,001
Niquel	mg/L	0,2
Plata	mg/L	0,05
Plomo	mg/L	0,05
Selenio	mg/L	0,05
Zinc	mg/L	24

Tabla 5 : Estándares nacionales de calidad ambiental para agua categoría 4
(conservación del ambiente acuático)

Parámetros	Unidades	Lagunas y lagos	Ríos		Ecosistemas marino costeros	
			Costa y sierra	Selva	Estuarios	Marinos
Inorgánicos						
Arsénico	mg/L	0,01	0,05	0,05	0,05	0,05
Bario	mg/L	0,7	0,7	1	1	-----
Cadmio	mg/L	0,004	0,004	0,004	0,005	0,005
Cobre	mg/L	0,02	0,02	0,02	0,05	0,05
Cromo VI	mg/L	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Mercurio	mg/L	0,0001	0,0001	0,0001	0,001	0,0001
Níquel	mg/L	0,025	0,025	0,025	0,002	0,0082
Plomo	mg/L	0,001	0,001	0,001	0,0081	0,0081
Silicatos	mg/L	-----	-----	-----	-----	0,14-0,7
Zinc	mg/L	0,03	0,03	0,3	0,03	0,081

Nota: Aquellos parámetros que no tienen valor asignado se debe reportar cuando de dispone de análisis

**Tabla 6 : Límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades
minería - metalúrgicas**

Parámetro	Unidad	Límite en cualquier momento	Límite para el promedio anual
pH	mg/L	6-9	6-9
Sólidos totales en suspensión	mg/L	50	25
Aceites y grasas	mg/L	20	16
Cianuro total	mg/L	1	0,8
Arsenico total	mg/L	0,1	0,08
Cadmio total	mg/L	0,05	0,04
Cromo VI	mg/L	0,1	0,08
Cobre total	mg/L	0,5	0,4
Hierro (disuelto)	mg/L	2	1,6
Plomo total	mg/L	0,2	0,16
Mercurio total	mg/L	0,002	0,0016
Zinc total	mg/L	1,5	1,2

Fuente: "El Peruano", Lima, sábado 21 de agosto de 2010 ,normas legales.

ANEXO 3. FOTOS



Foto 1: Izquierda(muestras de *Eichhornia crassipes* (jacinto de agua) luego de ser sometidas a una solución de 5ppm de cadmio y mercurio) derecha (muestra de jacinto de agua recolectada luego después de 7 días).

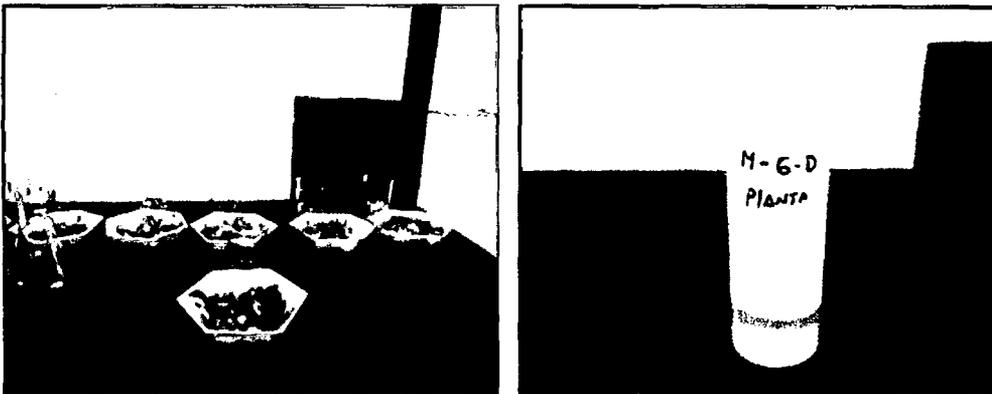


Foto 2: Izquierda (muestras de *Eichhornia crassipes* (jacinto de agua) trituradas y homogenizadas para ser digeridas) derecha (muestra del digestado de jacinto de agua recolectado después de 6 días).

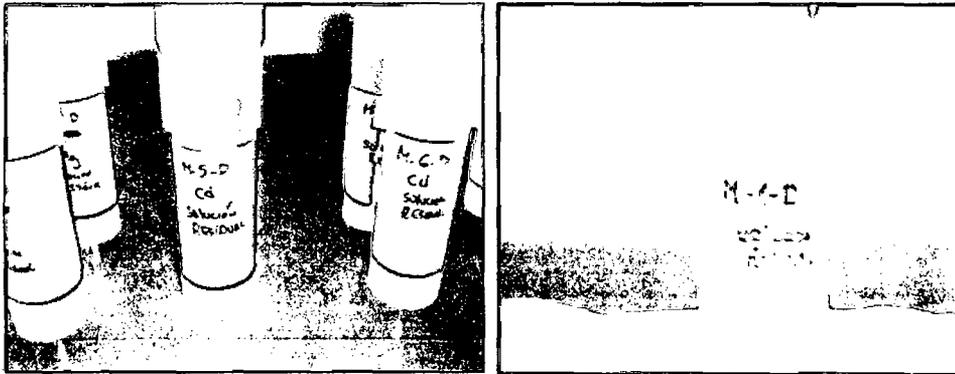


Foto 3: Izquierda (muestras de solución residual) tomadas y etiquetadas en digitubos con su respectiva identificación para luego ser digeridas) derecha (muestra de solución residual recolectada luego después de 1 día).



Foto 4: Muestras con su respectiva identificación en la prueba de remoción de Cd (II) y Hg (II).

ANEXO 4. Figuras

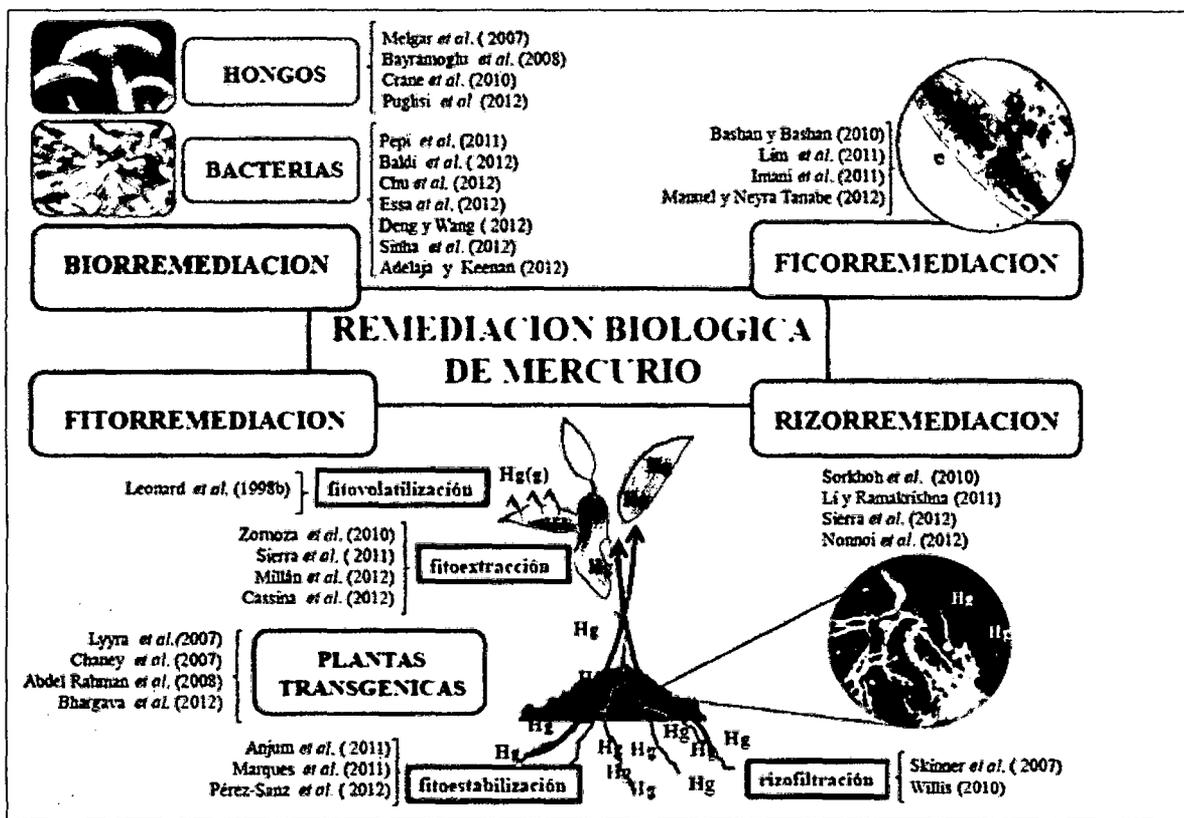


Figura 1: Esquema de las estrategias de remediación biológica de Hg y Las mas recientes y/o destacadas investigaciones que contribuyen al desarrollo y conocimiento del metabolismo y remoción del metal.^[98]