

## EVALUACIÓN DE LA PLANTA *Lemna minor* COMO BIORREMEDIADORA DE AGUAS CONTAMINADAS CON MERCURIO

## EVALUATION OF THE PLANT *Lemna minor* FOR THE BIOREMEDIATION OF WATER CONTAMINATED WITH MERCURY

**Adolfo D. Arenas, Lué-Merú Marcó y Gosmyr Torres**

Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía, Dpto. De Química y Suelos,  
Cabudare, Estado Lara - Venezuela  
(e-mail: luemerumarco@yahoo.es)

Recibido: 08/11/2010 - Evaluado: 20/12/2010 - Aceptado: 21/01/2011

### RESUMEN

Se evaluó la capacidad biorremediadora de *Lemna minor* en función del tiempo en aguas contaminadas con mercurio mediante un diseño experimental de 3 bloques al azar con cinco réplicas: un grupo experimental con 100 g de *Lemna*, 7,5 L de agua contaminada con Hg ( $0,13 \text{ mgL}^{-1}$ ) y solución nutritiva; un grupo Testigo con 100 g de *Lemna*, 7,5 L de agua y solución nutritiva y un grupo control con mercurio al nivel de  $0,13 \text{ mgL}^{-1}$  en agua destilada sin plantas. La eficiencia de remoción de mercurio de la *Lemna minor*, en 22 días, fue de 30%. Las variables peso fresco, peso seco, y nitrógeno y fósforo foliares no presentaron diferencias significativas entre los dos tratamientos. La absorción de potasio, fue afectada por los niveles de mercurio. La planta *Lemna minor* representa una alternativa para la remoción de mercurio en aguas contaminadas hasta un nivel de  $0,13 \text{ mg/L}$ .

### ABSTRACT

The bioremediation efficiency of the plant *Lemna minor* in waters contaminated with mercury was tested using an experimental design conformed by three blocks at random with five replicates each one: an experimental group with 100 g of *Lemna minor*, 7.5 L of water contaminated with Hg to a level of  $0.13 \text{ mgL}^{-1}$  and nutrient solution; a control group with 100g of *Lemna minor*, 7.5 L of water and nutrient solution, and a control group with mercury at a concentration of  $0.13 \text{ mgL}^{-1}$ , in distilled water without plants. The mercury removal efficiency of *Lemna minor* in 22 days was 30%. The variables fresh biomass, dry biomass and foliar nitrogen and phosphorous did not shown significant differences between both treatments. Potassium absorption was affected by the mercury levels. Plant *Lemna minor* is a reliable option for mercury removal from water at the level of  $0.13 \text{ mgL}^{-1}$  of contamination.

Palabras clave: bioacumulación; ditizona; biorremediación; mercurio

Keywords: bioaccumulation; dithizone; bioremediation; mercury

## INTRODUCCIÓN

El crecimiento acelerado y el desarrollo son directamente proporcionales al impacto ambiental, especialmente sobre los cuerpos de agua, debido al manejo inadecuado de las aguas residuales de origen industrial, agrícola y urbano, además de las actividades mineras legales e ilegales, artesanales e industriales. Es necesario promover el desarrollo de tecnologías que ayuden a mejorar la calidad de los efluentes y que al mismo tiempo sean adecuadas al contexto socioeconómico del país (Carrasquero, 2002).

La contaminación de origen industrial es la mayor fuente de contaminación de las aguas. Los metales pueden encontrarse de forma natural en las aguas no contaminadas dependiendo del tipo de suelo y la geología, a lo largo de una corriente superficial, en concentraciones que no representan peligro para la biodiversidad, siendo muchos de éstos necesarios para la vida acuática y para la salud humana.

Las actividades antropogénicas han incrementado significativamente las concentraciones de mercurio en el ambiente. La contaminación acuática por mercurio, generada por el proceso de industrialización o por procesos naturales, constituye uno de los problemas ambientales más críticos en la actualidad, debido a su alta toxicidad, persistencia y capacidad de bioacumulación y bioconcentración. En los ambientes contaminados por metales pesados se altera la capacidad de supervivencia de los organismos, lo que afecta la dinámica poblacional de las especies y, por tanto, la estructura y función ecosistémica. El mercurio sufre procesos de liberación desde sedimentos y suelos contaminados a ríos, lagos y otras fuentes de agua, procesos que pueden estar incrementando esta liberación como consecuencia del calentamiento global (Metcalf y Eddy, 1995).

En el conjunto de propiedades fisicoquímicas del mercurio se encuentra la formación de amalgamas con otros metales, entre los cuales aparece el oro de obvia importancia para el hombre. Esta propiedad le ha valido al mercurio su extensa utilización en la práctica de la actividad minera en varios países del mundo. En el caso particular de Venezuela, la cuenca del Río Caroní sufre, desde hace aproximadamente 12 años, una desmesurada explotación de oro y plata, con un porcentaje alarmante de minería informal, la cual no contempla rigurosamente las normas de control ambiental requeridas por dicha actividad. Debido a la ubicación en esta cuenca de zonas de alta densidad poblacional, lo cual representa potencialmente un grave problema de salud pública, se hace necesario la implementación de medidas y campañas normativas que regulen la utilización de mercurio en la actividad minera (Herrero et al., 2004). Latorraca (2003), estudió las concentraciones de mercurio en la ictiofauna de la cuenca del río Caroní, Edo Bolívar. Los resultados obtenidos para Hg presentaron tres poblaciones de datos, la primera con baja concentración ( $0,12 \text{ ug g}^{-1}$ ) representada principalmente por especies herbívoras, la segunda, y la de mayor proporción de individuos con promedio de  $0,79 \text{ ug g}^{-1}$ , representada por especies carnívoras, y la tercera con altas concentraciones de Hg ( $2,37 \text{ ug g}^{-1}$ ), también representada por especies carnívoras en su mayoría. Pirela y Casler (2005), realizaron una investigación donde determinaron las concentraciones totales de mercurio en muestras compuestas de tejido muscular e hígado de aves provenientes de un área natural localizada al norte del sistema del Lago de Maracaibo, occidente de Venezuela. Las concentraciones promedio, en todas las especies, excedieron los límites permisibles de mercurio para el ser humano ( $>0,3 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), determinando que la acumulación de este metal se ha incrementado gradualmente en peces, sedimentos y agua.

Silva et al. (2004), realizaron un estudio epidemiológico y clínico en poblaciones del bajo Caroní (Río Claro y Carhuachi) con el fin de evaluar la situación actual de contaminación mercurial. Se estudiaron 40 pobladores, divididos en dos grupos (Mineros y no mineros) mayores de 14 años, con permanencia en la zona mayor a 1 año. No se observó diferencia en el promedio de los niveles de mercurio entre ambos grupos. El 70% de la población estudiada presentó síntomas asociados a intoxicación mercurial.

Los trabajos anteriormente mencionados demuestran la necesidad de medidas tendientes a la prevención y remediación de la contaminación mercurial en Venezuela. El manejo de las aguas residuales representa un escollo, debido a las grandes inversiones que deben de realizarse en plantas de tratamiento con el fin de

depurar estas aguas antes de su vertido a una fuente superficial. De allí ha surgido la necesidad de investigar técnicas innovadoras para el tratamiento de estos desechos a bajos costos, como es el caso del tratamiento con plantas acuáticas.

Las macrófitas acuáticas han sido consideradas como una plaga debido a su rápido crecimiento, ya que en ocasiones llegan a invadir lagunas y generan varios problemas. Sin embargo, si las plantas acuáticas se manejan adecuadamente, su poder de proliferación, su capacidad de absorción de nutrientes y bioacumulación de otros compuestos del agua, las convierten en una herramienta útil en el tratamiento de aguas residuales.

Algunas plantas acuáticas tienen una alta capacidad para acumular elementos pesados y tóxicos por diferentes mecanismos (Kara y Kara, 2007; Li, 2003), permitiendo entonces la purificación de aguas altamente contaminadas, debido a las descargas industriales o de agroquímicos (Maine et al., 2001; Chua, 1998; So et al., 2003). Las especies de "Jacinto de agua" (*Eichhornia crassipes*) y *Lemna minor* se han usado previamente para la descontaminación o reducción de los niveles de contaminantes en el agua.

Kiran (1991), probó cuatro plantas acuáticas (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Salvinia rotundifolia* y *Lemna minor*) y evaluó la remoción de nitrógeno y fósforo. Se demostró el alto potencial de estas plantas acuáticas para la remoción de N y P, reducción de la Demanda Bioquímica de Oxígeno y la Demanda Química de Oxígeno.

De Souza et al. (1999), estudiaron la fitoacumulación de elementos traza Cd (II), Cr (VI), Cu (II), Ni (II), Se (VI) con la especie (*Eichhornia crassipes*) con concentraciones en el rango de 0,1 a 10 mgL<sup>-1</sup> en un periodo de 14 días. Para un nivel de concentración de 0,10 mg/L las capacidades de bioacumulación fueron: 1,85 mg Cd/Kg.d; 1,15 mg Cu/Kg.d; 0,53 mg Cr/Kg.d; 0,58 mg Se/Kg.d y 1,04 mg Ni/Kg.d. Shaban et al. (2005), demostraron que las raíces muertas del "Jacinto de agua" pueden remover rápidamente el arsénico del agua.

Posada y Arroyave (2006), realizaron una descripción de los efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales y sobre los ecosistemas donde habitan. Adicionalmente, recomendaron un protocolo para realizar pruebas de toxicidad con la "Lenteja de agua" (*Lemna minor*) presentando los resultados de los preensayos con diferentes concentraciones de sales de mercurio en condiciones de laboratorio. Se encontró que la biodisponibilidad del mercurio depende de factores que facilitan la disolución del elemento en el agua. Algunas plantas actúan como bioindicadores de la presencia de este metal en el medio al retenerlo selectivamente; mientras que otras se comportan como bioacumuladoras al tolerar su presencia y acumularlo en su estructura, y pueden dar paso a la biomagnificación a través de la cadena trófica. Sugieren que las concentraciones de sal de mercurio adecuadas para la realización de pruebas de toxicidad con *Lemna minor* deben estar entre 0,01 mg/L y 10,0 mg/L.

El "Jacinto de agua" y la *Lemna minor* fueron evaluados y comparados en función de la capacidad de remoción de arsénico del agua (Alvarado et al., 2008). La concentración de arsénico fue determinada en función del tiempo en el agua y el tejido foliar bajo condiciones controladas a un nivel de contaminación de 0,15 mgL<sup>-1</sup> y en grupos control; ambas especies presentaron una capacidad de remoción del elemento apropiada para su aplicación en fitoremediación. De igual forma, Leblebici y Aksoy (2011) compararon las especies *Lemna minor* y *Spirodela polyrhiza* en su capacidad para acumular plomo en bajas concentraciones en agua y determinaron el efecto del enriquecimiento de la concentración de nutrientes, observando un aumento en la tolerancia al contaminante y una mayor capacidad de extracción para la especie *Lemna minor*.

La "Lenteja de agua" (*Lemna minor*), con una capacidad de absorción de metales pesados entre ellos el mercurio, surge como una posible solución para remediar mercurio en lagos y ríos. Se persigue con este estudio determinar la capacidad bioacumuladora de mercurio de la planta acuática *Lemna minor*, como alternativa en la remediación de aguas contaminadas con este elemento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se basó en una investigación de naturaleza experimental, en la cual las variables dependientes (concentración de nitrógeno, fósforo, potasio y mercurio foliar; y mercurio en el agua en función del tiempo) estuvieron sujetas a la acción de las variables independientes (concentración inicial de mercurio en el agua, concentración y cantidad de la solución nutritiva agregada diariamente y tiempo de exposición).

### Procedimiento experimental

El ensayo se instaló en un cobertizo ubicado en la Estación Experimental "Miguel Luna Lugo" del Decanato de Agronomía de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" en el sector Tarabana, Municipio Palavecino, Estado Lara, Venezuela. El área donde se encuentra este núcleo está caracterizada, según Holdridge et al. (1971), como un bosque muy seco tropical, tiene una altura de 510 m.s.n.m., la precipitación promedio anual es de 658,3 mm, la evaporación promedio tiene el valor de 2048,1 mm anuales, la temperatura promedio anual presenta un valor de 25,1°C, la insolación diaria promedio es de 7,9 horas y la humedad relativa media es de aproximadamente 70%. La latitud es de 10°1'25"N y la longitud 69°17'W.

El experimento se llevó a cabo bajo un diseño completamente al azar y estuvo conformado por 3 grupos con 5 repeticiones; 1 grupo control (agua destilada + mercurio) y un grupo Testigo (agua destilada + *Lemna minor*) y un grupo Experimental (agua destilada + mercurio + *Lemna minor*).

Debido a la ausencia de plantas en el núcleo universitario o en las adyacencias del mismo, las plantas fueron colectadas en otra zona, específicamente en las instalaciones de "Sistema de Agricultura Tropical Sostenible" de la Fundación DANAC; ubicada en la población de San Rafael en el Estado Yaracuy, Venezuela. Las plantas fueron cosechadas de las lagunas de estabilización existentes en dichas instalaciones, extraídas con coladores metálicos de 0,35 m<sup>2</sup>, y se transportaron en bolsas plásticas de 20 L con agua de las lagunas, a temperatura ambiente (25 °C). No existen evidencias de fuentes de mercurio cercanas al área de las lagunas estabilización. Por otra parte éstas conforman un sistema cerrado y controlado para el tratamiento de efluentes de una producción porcina, con altos contenidos de nitrógeno y fósforo.

Las plantas fueron aclimatadas en el cobertizo de la estación experimental "Miguel Luna Lugo" hasta el momento de la realización del experimento. Esta fase se consideró absolutamente necesaria pues permitió determinar si la planta puede adaptarse a las condiciones reinantes en el cobertizo. Las plantas fueron distribuidas en recipientes plásticos de 8 L con un área de lámina de agua de 300 cm<sup>2</sup> en porciones de 80 g. El agua utilizada en la aclimatación consistió de una mezcla de agua de las lagunas de estabilización con agua destilada (1:4). El proceso tuvo una duración de siete días. Posteriormente las plantas fueron extraídas, pesadas en grupos de 100 g de peso fresco y distribuidas al azar en los envases, para la realización del ensayo. El grupo control estuvo representado por 5 recipientes plásticos de 8,00 L cada uno, a los cuales se les agregó 7,50 L de agua destilada, y 10 ml de solución de mercurio con una concentración de 100 mgL<sup>-1</sup>, el grupo Testigo estuvo representado por 5 recipientes plásticos de 8,00 L cada uno, los cuales contenían 7,50 L de agua destilada y 100 g de *Lemna minor* y el grupo Experimental conformado por 5 recipientes plásticos de 8,00 L cada uno, los cuales contenían 7,50 L de agua destilada, 100 g de *Lemna minor* y 10 ml de cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) con una concentración de mercurio de 100 mgL<sup>-1</sup>. A cada uno de estos grupos se le suministró cada tres días 10 ml de solución nutritiva preparada de acuerdo a Alvarado et al. (2008). El nivel de agua se mantuvo constante mediante la reposición interdiaria del agua perdida por evapotranspiración. Para ello se marcó un aforo de 7,5 L que se completaba con agua destilada. Todas las muestras de agua fueron tomadas después de asegurar el aforo mencionado.

### Determinaciones y análisis

Para la determinación de la biomasa (peso fresco y peso seco) se tomaron al inicio del ensayo tres muestras frescas de 5 g cada una; se llevaron a estufa por 24 horas a una temperatura de 85 °C para calcular el peso

seco. Al final del ensayo se recolectó la totalidad de la biomasa en cada réplica de cada grupo y se realizó el procedimiento nuevamente, para determinar la ganancia de biomasa como peso fresco, el peso seco y el porcentaje de peso seco.

Se determinaron los niveles de nitrógeno, fósforo, potasio y mercurio en el tejido vegetal de la *Lemna minor* al inicio y al final del ensayo. Se determinó el mercurio en muestras de agua de todos los tratamientos los días 0, 6, 10, 13, 15, 17, 20 y 22. Las muestras foliares fueron analizadas después de su digestión húmeda, mientras que las muestras de agua fueron analizadas directamente.

Para el análisis de las muestras foliares las hojas frescas fueron lavadas con abundante agua destilada y detergente, luego fueron enjuagadas con agua destilada para remover todo el detergente y posteriormente se colocaron en papel absorbente. Las muestras se secaron en la estufa de circulación forzada a 85 °C, dispuestas en sacos de papel perforado. Las muestras secas fueron molidas con un molino de acero inoxidable y se pasaron luego por un colador de malla de 1mm, se acondicionaron en frascos de vidrio con tapa plástica y se identificaron. Se realizó la digestión húmeda de las mismas con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno, mediante la metodología descrita en Malavolta et al. (1997), con ligeras modificaciones para evitar la volatilización del mercurio. Para ello se pesó 1 g de material vegetal seco y se transfirió a un vaso de precipitado. Se adicionaron 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado al 95 % y se dejó en reposo por 15 minutos. Se colocó en una plancha de calentamiento fría y se elevó la temperatura gradualmente hasta 80 °C aproximadamente. Después de la aparición de vapores oscuros se retiró el vaso, se dejó enfriar y se adicionaron 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 95 %. Se calentó nuevamente hasta obtener un extracto incoloro. Se retiró de la plancha y se adicionaron 5 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se filtró y transfirió cuantitativamente al balón de 50 ml y se aforó.

La determinación de nitrógeno total se realizó por el método del fenato, en los extractos o muestras digeridas de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (Eaton et al., 1995). La determinación de fósforo se realizó por el método del Molibdato-vanadato (Eaton et al., 1995), en los extractos ácidos, al igual que con el nitrógeno. Para la determinación de potasio se utilizó el procedimiento descrito por Malavolta et al. (1997) para potasio en muestras foliares por la técnica de emisión en llama. Para la determinación de mercurio en muestras de agua y foliares se desarrolló y validó una metodología analítica por espectrometría uv-visible, basada en el procedimiento descrito por Khan et al. (2005). El diseño involucró importantes modificaciones al procedimiento descrito por Khan et al. (2005). Se sustituyeron reactivos en función de los disponibles en el laboratorio y se re-escalaron los volúmenes para disminuir el consumo de muestras y reactivos. Se tomaron 2 mL de muestra de agua, blancos de reactivos y patrones acuosos de mercurio (0,05 mgL<sup>-1</sup> mg/L) o extracto foliar (diluido 1:1), se digirieron en tubos de ensayo con ácido sulfúrico 1M y se colorearon con gotas de permanganato de potasio (2% m/V) en baño térmico a 70 °C durante 30 minutos para la conversión del mercurio presente a Hg(II). Se añadieron aproximadamente 4 gotas de Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en caliente para decolorar el exceso de permanganato. El pH se ajustó a 1,8 añadiendo NaOH 2M. Posteriormente para evitar interferencias se añadió 1 ml de solución de EDTA al 1%. Finalmente se agregaron al tubo de ensayo 3 ml de Ditizona 0,0003 % en Cloroformo. Se agitó vigorosamente en vórtex. Se separó la fase acuosa de la fase orgánica con una pipeta Pasteur. La fase orgánica que contiene el complejo coloreado del ditizonato de mercurio se transfirió a la celda de cuarzo. Se midió la absorbancia a 490 nm para muestras, blancos y patrones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relación peso fresco/peso seco de las plantas, ganancia de biomasa

La relación entre el peso fresco y el peso seco proporcionó una herramienta para el estudio del comportamiento de la planta (Tabla 1). El promedio fue de 5,3 % de materia seca para las muestras al inicio (M<sub>in</sub>). En el grupo testigo (*Lemna minor* en agua sin mercurio) hay un incremento en la biomasa de 64,46 g (Tabla 2), el análisis estadístico aplicado fue la comparación de medias del porcentaje de peso seco al principio y al final a través de la prueba T de student, revelando diferencias significativas al nivel de confianza de P = 0,05 (valor obtenido 0,00668).

En el grupo experimental (Lemna con mercurio), el incremento de biomasa fue de 62,18 g e igualmente se observó una ganancia de biomasa, al igual que el grupo testigo, como lo demostró la comparación de medias con la prueba de T de student, revelando diferencias significativas con un nivel de confianza de  $P = 0,05$  (valor obtenido = 0,00415) en cuanto a los pesos iniciales y finales del grupo experimental. Se observa por tanto un aumento de la biomasa fresca tanto en el grupo testigo como en el grupo experimental. El análisis estadístico realizado a los datos reveló al comparar el peso fresco final de grupo Testigo contra el peso fresco final del grupo Experimental que no existieron diferencias significativas a un nivel de confianza  $P = 0,05$  según la prueba T (Valor obtenido = 0,3140), igualmente al comparar el peso seco final de grupo Testigo contra el peso seco final del grupo Experimental no se encontraron diferencias significativas con un nivel de confianza de  $P = 0,05$ , según la prueba T (Valor obtenido = 0,3323)

Tabla 1: Variables agronómicas de las muestras analizadas

Grupo	Biomasa fresca inicial (g)	Peso seco inicial (g)	Porcentaje peso seco inicial	Ganancia de biomasa fresca (g)	Peso seco final (g)	% peso seco final
Grupo testigo	100	5,30±0,42	5,30±0,42	64±36	10±3	6,7±0,3
Grupo experimental	100	5,30±0,42	5,30±0,42	62±24	11±2	6,9±0,8

El hecho de que el grupo Experimental y el grupo testigo presenten pesos estadísticamente iguales al final del ensayo, demuestra que la concentración de mercurio en el agua no ejerció un efecto tóxico severo en la planta, logrando una acumulación de materia seca en comparación al grupo testigo estadísticamente igual evidenciando que estas concentraciones son tolerables para el desarrollo biológico de la *Lemna minor*. Así se ha demostrado en el trabajo realizado por Posada y Arroyave (2006), donde a concentraciones de 0,1 a 1 mgL<sup>-1</sup>, la planta presenta una adaptación y recuperación rápida en el crecimiento, continuando su normal desarrollo. En este trabajo la *Lemna minor* estaba presente en un medio con una concentración de 0,133 mgL<sup>-1</sup>.

En cuanto al porcentaje de ganancia de biomasa de materia seca, se observan valores bajos para los dos grupos, esto en comparación a trabajo realizados anteriormente donde la ganancia de biomasa de materia seca fueron mayores al 20% (Virgüez, 2004). Se pueden atribuir estos resultados al hecho de que la solución nutritiva fue añadida en una dosis de mantenimiento para las funciones mínimas necesarias de la planta en su desarrollo y para una baja ganancia de biomasa; las condiciones climáticas jugaron un papel importante en estos resultados, el microclima creado dentro del umbráculo donde se encontraba la planta pudo haber ejercido efecto sobre las mismas, apreciándose altas temperaturas y evaporación constantes en los recipientes. Este efecto es observado por Alvarado et al. (2008) en la evaluación de la remoción de arsénico por la planta *Lemna minor*.

Las similitudes de peso seco y fresco entre el grupo Testigo y Experimental permiten verificar que la planta fue capaz de continuar con su proceso natural de crecimiento vegetativo e inclusive logró completar la fase de desarrollo reproductivo, ya que en los recipientes se observaba claramente la aparición de nuevas plántulas; ratificando este hecho que la planta pudo adaptarse a las condiciones químicas de contaminación con mercurio.

#### Concentraciones de N-P-K

Se determinaron para esta investigación los valores de N-P-K al inicio y al final del ensayo para las muestras foliares digeridas (ver tabla 2), obteniendo resultados sin diferencias significativas para nitrógeno y fósforo de acuerdo a la prueba de T de student, con un nivel de confianza de  $P = 0,05$ , dando un valor de 0,9265 para el nitrógeno y de 0,2713 para el fósforo. La concentración de potasio del grupo experimental es significativamente menor respecto al grupo testigo, en el cual se incrementó significativamente la concentración respecto al inicio. Los resultados para P y N son bajos al compararlos con los obtenidos por Pedraza (1994), donde se determinó el contenido nutricional de *Lemna ssp.* (N = 4,83 %, P = 1,37 % y K = 4,56 %) , pero hay que hacer énfasis en las

condiciones, descritas anteriormente, ya que el ensayo realizado por este autor, se elaboró en un medio alto en nutrientes (aguas provenientes de granjas de cerdos).

Tabla 2: Concentraciones de N-P-K, en el tejido foliar de *Lemna minor* al inicio y al final del ensayo.

	Testigo	Experimental	Inicio
<b>Potasio (%)</b>	2,43 ± 0,04	1,90 ± 0,20	1,99 ± 0,20
<b>Nitrógeno(%)</b>	1,61 ± 0,63	1,57 ± 0,56	0,086 ± 0,009
<b>Fósforo (%)</b>	2,03 ± 0,03	2,10 ± 0,10	1,80 ± 0,2

#### Resultados de la determinación de mercurio

Determinación de la exactitud del método: la exactitud se determinó con la muestra de agua certificada del proyecto ARCAL RLA 010, elaborada por la empresa SPEX CERTIPREP. El valor reportado para la muestra ARCAL es de (5,00 +/- 0,10) mgL<sup>-1</sup>. Mientras que el valor encontrado al utilizar el protocolo fue de (4,5 +/- 0,4) mgL<sup>-1</sup>. La desviación fue de 10% para agua. El análisis del resultado con la prueba Z indica un Z menor a 2 (0,90), tomando en cuenta la incertidumbre expandida del resultado. En las muestras foliares la exactitud se verificó mediante los métodos de adición de estándares y porcentaje de recuperación o añadido y recobrado. Para el procedimiento se utilizó una muestra foliar (Número 19). Para esta prueba se procedió a tomar las muestras 0,05 ppm; 0,25 mgL<sup>-1</sup> y 0,4 mgL<sup>-1</sup> y se añadió la muestra 19 del grupo experimental, obteniéndose una recuperación de 120 % ± 26%.

Concentración de mercurio en las muestras de agua y balance de masas: En el grupo testigo que contenía *Lemna minor* sin la presencia de mercurio, se observó una línea horizontal indicando la estabilización del mercurio en el agua por debajo del límite de detección.

Para el grupo control (mercurio sin plantas) se observó una disminución importante del mercurio en el agua a los 6 días hasta 0,031 mgL<sup>-1</sup>, siendo la concentración inicial de 0,22 mgL<sup>-1</sup> (ver Figura 1). Después del día 6 se observa que las concentraciones se mantienen estables. Esto corresponde a la cinética del mercurio durante el ensayo. Parte del mercurio añadido presumiblemente precipitó al fondo y otra parte quedó adherido a la superficie del envase, no quedando disponible al momento del muestreo. Hay que tomar en cuenta la volatilidad del mercurio, ya que el agua estaba expuesta a condiciones de umbráculo, registrándose pérdida de agua por evaporación y por consiguiente se podría volatilizar mercurio por este mecanismo; todos estos factores disminuyen las concentraciones.

Para el grupo experimental la concentración inicial fue de 0,135 mgL<sup>-1</sup> y culmina con una caída para el día 6 a 0,027 mgL<sup>-1</sup> (ver Figura 1). Para todos los grupos a diferencia del testigo, se evidenció este comportamiento en el agua al sexto día. Al final del experimento las concentraciones de mercurio foliar fueron en promedio 40 µg por gramo de peso seco de tejido vegetal de la *Lemna minor*, demostrando que una parte del mercurio fue absorbida por la planta.

El proceso de biorremediación se puede explicar según Wang et al. (1996), quienes exponen que la acumulación de metales por los organismos acuáticos se presenta en un proceso que consiste en dos pasos: un primer paso de absorción rápida o vinculación a la superficie biológica (biosorción), seguido por un segundo paso de transporte lento e irreversible, controlado por difusión al interior de la célula (bioacumulación), que puede ser por difusión del ión metálico a través de la membrana celular o por transporte activo por una proteína transportadora. Según Metcalf y Eddy (1995) y Miretzky et al. (2006), el mecanismo involucrado en la biosorción de los metales pesados es a través de un intercambio de iones entre metales monovalentes como iones móviles

intercambiables presentes en la biomasa de las macrófitas e iones de metales pesados y protones tomados desde el agua, esta biosorción llega a un punto de saturación según Oporto et al. (2001), quienes lo consideraron como un fenómeno superficial de adsorción monocapa, caracterizado por una capacidad máxima por parte del adsorbente, el cual, después de un cierto tiempo de contacto con la solución, llega a un nivel de saturación en el que la concentración de la sustancia de interés en el adsorbente es constante; después del día 6 se libera parte del mercurio retenido, haciéndolo disponible nuevamente en el agua, elevando la concentración a  $0,026 \mu\text{gL}^{-1}$ .

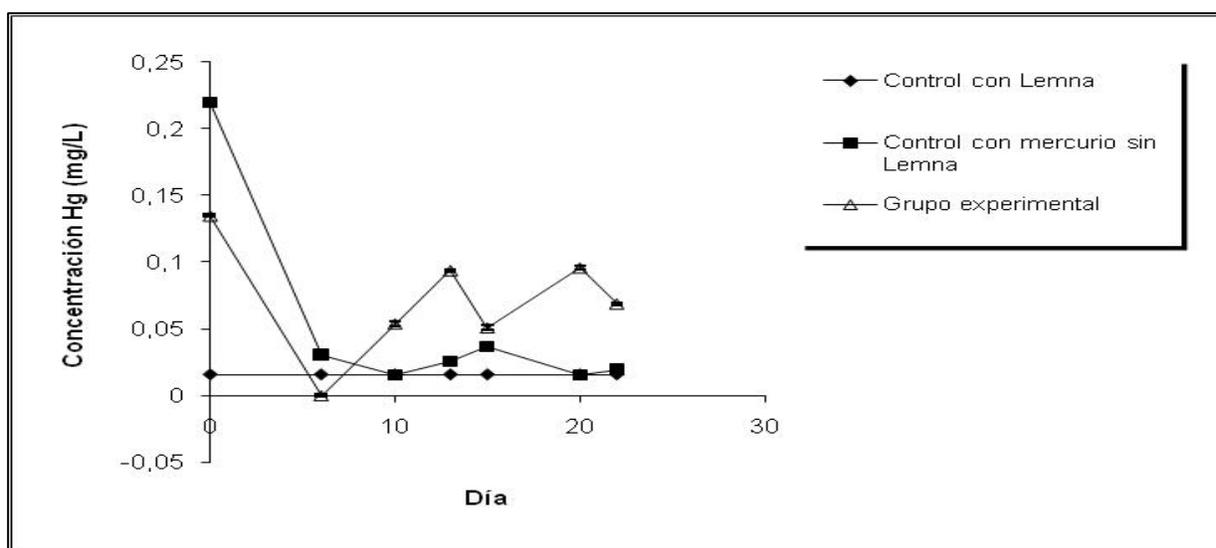


Fig. 1: Concentración de mercurio en función del tiempo, para todos los tratamientos.

Para el día 13, estos resultados coinciden con lo encontrado por Burk y Weis (2000), quienes mencionan que las plantas acuáticas acumulan gran cantidad de metales pesados en sus tejidos como mercurio (Hg), cadmio (Cd), plomo (Pb), arsénico (As), cromo (Cr), los cuales son liberados posteriormente al medio. Posada y Arroyave (2006), observaron que para concentraciones de mercurio en el rango de  $0,10 \text{ mgL}^{-1}$  y  $1,00 \text{ mgL}^{-1}$  se presentó una caída en su crecimiento hasta el día 4, después de lo cual la *Lemna minor* se recupera y mantiene constante el crecimiento. En concordancia con la experiencia de Posada y Arroyave (2006), un porcentaje de las "Lentejas de agua" muere liberando posteriormente el mercurio absorbido, hasta el día 13 que se inicia la reabsorción nuevamente del mercurio, después de un periodo de recuperación de la planta, donde nuevamente comienza un periodo de absorción hasta el día 15, llegando a bajar las concentraciones en el agua hasta  $0,051 \text{ mgL}^{-1}$ . El nuevo proceso de recuperación de la planta perdura hasta el día 20. A diferencia del primer periodo de recuperación que se prolongó durante 7 días (desde el día 6 hasta el 13), la Lemna se va adaptando a estas concentraciones de mercurio, y su recuperación se hace cada vez más rápida, iniciando luego una nueva absorción del metal pesado. Autores como Mentaberry (2009), describen los mecanismos de evasión o tolerancia, de tres formas, captación celular limitada (evasión), metabolismo resistente a metales pesados y detoxificación por quelación, compartimentalización o precipitación; estos procesos y mecanismos de la planta, específicamente las macrófitas, crearon el comportamiento característico, que explica este proceso de absorción, expulsión y reabsorción del mercurio de una manera cíclica. Resultados similares fueron obtenidos por Alvarado et al. (2008), donde se evaluó la remoción de arsénico y se observó una cinética similar.

Es importante acotar la falta de exactitud en la literatura y en trabajos de investigación, del proceso de las macrófitas con los metales pesados, si los iones metálicos son absorbidos o por el contrario son adheridos a las partes de las plantas.

En el balance de masa (Tabla 3), se observa que la masa total de mercurio en el tejido foliar de *Lemna minor* fue de 300  $\mu\text{g}$ , y la masa final en el agua fue de 520  $\mu\text{g}$  con un error dispersado de 60, y un faltante de 180  $\mu\text{g}$  de los 1000  $\mu\text{g}$  añadidos, donde se infieren las pérdidas por evaporación, precipitación y adhesión a las paredes. Así lo exponen trabajos como los realizados por Wollenberg y Peters (2009), quienes exponen que estudios previos han demostrado la transpiración de Hg (0) por las plantas, por lo que es posible que la vegetación de plantas acuáticas que crean una alfombra sobre el espejo de agua aumente las emisiones a través de la transpiración de vapor de mercurio. Carvahlo (2001), también reportó el comportamiento de macrófitas que volatizaban elementos como el selenio, llamado este proceso fitovolatilización. Como resultado final se obtiene un valor de 40  $\mu\text{g}$  por cada gramo de peso seco de la *Lemna minor*, con una eficiencia de 30 % de remoción.

Tabla 3: Balance de masa de mercurio. Los valores entre paréntesis representan el error absoluto propagado

Balance de masa para Hg				
$\mu\text{g g}^{-1}$ de materia seca de Lemna	Masa total en la Lemna( $\mu\text{g}$ )	Masa final en el agua ( $\mu\text{g}$ )	Masa Añadida ( $\mu\text{g}$ )	% recuperación en 22 días
40 $\pm$ 13	300 (100)	520(60)	1000(100)	30(10)

## CONCLUSIONES

Los valores de ganancia de biomasa y peso seco al final de ensayo no se vieron afectados significativamente por la presencia de una concentración de mercurio 0,133  $\text{mgL}^{-1}$  en el medio, lo cual mostró un proceso de adaptación y tolerancia para esta concentración inicial añadida al medio. La eficiencia de la planta para remover Mercurio del agua fue del 30 %; por lo que puede afirmarse que la planta es eficiente para remover dicho elemento del agua. La cantidad del mercurio faltante en el balance de masa y la disminución de las concentraciones en grupo control sin *Lemna minor*, evidencian pérdidas por evaporación, fitovolatilización y precipitación. El periodo de máxima eficiencia de remoción de la *Lemna minor* ocurre durante los primeros 6 días. Las concentraciones de mercurio en el agua afectan la absorción de potasio en la planta. Las concentraciones de N y P foliar no son afectadas por los niveles de mercurio utilizados en el ensayo. El método diseñado para la determinación de mercurio resultó exacto y preciso, y con la sensibilidad adecuada para monitorear ensayos de biorremediación. La concentración final de mercurio en la *Lemna minor* se ubicó en 40  $\mu\text{g}$  por cada gramo de peso seco, del material vegetal. La planta *Lemna minor* puede utilizarse como una herramienta efectiva, sencilla y económica en los procesos de descontaminación del agua con niveles tóxicos de mercurio.

## AGRADECIMIENTOS

Al CDCHT-UCLA por el proyecto RAG001-2007 y al IAEA, proyecto ARCAL RLA010. Al Sr Junior Medina por el valioso apoyo durante los análisis químicos.

## REFERENCIAS.

- Alvarado S.; Guédez M.; Marcó L.; Graterol N.; Anzalone A. (2008); *Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (Eichhornia crassipes) and Lesser Duckweed (Lemna minor)*. Bioresource Technology: 19(17), 8436-8440.
- Burk, D.; Weis, J. (2000); *Release of metals by the leaves of the salt marsh grasses Spartina alterniflora and Phragmites australis*. Estuarine, Coastal and Shelf Science: 51, 153-159.

- Carrasquero, D. (2002); *Comparación de métodos para el análisis de mercurio en suelos procedentes del Callao, Estado Bolívar, Venezuela*. Interciencia: 27(4), 191-194.
- Carvalho, K. (2001); *Removal of Aqueous Selenium by Four Aquatic Plants*. Journal of Aquatic Plant Management: 39, 33-36.
- Chua, H. (1998); *Bio-accumulation of environmental residues of rare earth elements in aquatic flora Eichhornia crassipes (Mart.) Solms. in Guangdong Province of China*. The Science of Total Environment: 214, 79-85.
- De Souza, M.; Zhu, Y.; Zayed, A.; Quian, J.; Terry, N. (1999); *Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II Water hyacinth.*, Journal of Environmental Quality: 28, 339-344.
- Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E. (1995); *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation.
- Herrero, N.; Antonelli G.; Giménez P. (2004); *Diagnóstico de contaminación mercurial en la comunidad de Santa María del Vapor, Municipio Sifontes, Estado Bolívar*. Geominas: 32(35), 59-64.
- Holdridge, L.R.; Grenke, W.; Hatheway; W.H.; Liang, T.; Tosi, J.A. (1971); *Forest Environments in Tropical Life Zones: A Pilot Study*. Pergamon Press, Oxford,
- Kara, Y.; Kara, I. (2007); *Removal of Cadmium from Water Using Duckweed (Lemnatrisulca L.)*. International Journal of Agriculture and Biology: 7(4), 1560–8530.
- Khan, H.; Jamaluddin, A.; Bhangar, I. (2005); *A simple spectrophotometric determination of trace level mercury using 1,5-Difhenylthiocarbazone solubilized in micelle*. Analytical Sciences: 21(5), 507-512.
- Kiran, J. (1991); *Capacidad de retiro de nitrógeno y fósforo en las Capacidad de retiro del nitrógeno y fósforo de cuatro plantas elegidas en las charcas de aguas dulces tropicales*. Diario Conservación Ambiental: 18, 143–147.
- Latorraca, Z. (2003); *Concentración de mercurio en la Ictiofauna de la cuenca del Rio Caroní Estado Bolívar*. Tesis de Grado, Maestría en Gestión de los Recursos Naturales, mención cuencas, CENDES, Universidad Central de Venezuela. Disponible en: [http://150.185.68.13/cgi-win/be\\_alex.exe?Autor=Latorraca,+Zulady&Nombrebd=bibcentral&Sesion=167772247](http://150.185.68.13/cgi-win/be_alex.exe?Autor=Latorraca,+Zulady&Nombrebd=bibcentral&Sesion=167772247). Fecha de consulta: 10 de octubre de 2010.
- Leblebici, Z.; Aksoy, A. (2011); *Growth and Lead Accumulation Capacity of Lemna minor and Spirodela polyrhiza (Lemnaceae): Interactions with Nutrient Enrichment*. Water Air and Soil Pollution: 214, 175–184.
- Li, T. (2003); *A novel response of wild-type duckweed (Lemna paucicostata Hegelm.) to heavy metals*. Environmental Toxicology: 19(2), 95-102.
- Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, S.A. (1997); *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2a ed., Piracicaba: POTAFOS, 319p.
- Maine, M.A.; Duarte, M.V.; Sune, N.L. (2001); *Cadmium uptake by floating macrophytes*. Water Research: 35(11), 2629-2634.
- Mentaberry A. (2009); *Curso Agrobiotecnología, Fitorremediación Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires*. Disponible en: <http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/Fitorremediacion.pdf>. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2010.

- Metcalf, L.; Eddy, H. (1995); *Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización*. 3ra edición. McGraw-Hill/interamericana de España S.A. Madrid. 1485 pp.
- Miretzky, P.; Saralegui, A.; Fernández, C. (2006); *Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes*. *Chemosphere*: 62(2), 247-254.
- Oporto, C.; Arce, O.; De Pauw, N.; Van den Broeck, E. (2001); *Evaluación del potencial de lemna minor para la remoción de Cr (VI) de aguas residuales*. *Revista Boliviana de Ecología*: 10, 17-27.
- Pedraza, G.X. (1994); *Reciclaje del efluente de origen animal con tres especies de plantas acuáticas*. *Livestock Research for Rural Development*: 6(1). Disponible en: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/afri/espanol/document/lrrd/LRRD6/1/GLORIA.HTM>. Fecha de consulta: 10 de octubre de 2010.
- Pirela D.; Casler C. (2005); *Concentraciones de mercurio en tejidos de aves acuáticas, en el norte del sistema del lago de Maracaibo, occidente de Venezuela*. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*: 39(2), 108-127.
- Posada, M.; Arroyave, M. (2006); *Efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales*. *Revista de la Escuela de Ingeniería de Antioquia*. EIA: 6, 57-67.
- Shaban, W.; Rmalli, A.; Harrington, C.F.; Ayub, M.; Parvez, I.; Haris, I. (2005); *A biomaterial based approach for arsenic removal from water*. *Journal of Environmental Monitoring*: 7, 279-282.
- Silva M; Arredondo, I.; Arriojas, S.; Chadi, N.; Loreto, A.; Molina, E. (2004); *Determinación de factores epidemiológicos y clínicos en personas expuestas al mercurio en dos poblaciones del Bajo Caroní, Estado Bolívar, Venezuela*. *Geominas*: 32(34), 19-22.
- So, L.M.; Chu, L.M.; Wong, P.K. (2003); *Microbial enhancement of Cu<sup>2+</sup> removal capacity of Eichhornia crassipes (Mart.)*. *Chemosphere*: 52, 1499-1503.
- Virgüez V. (2004); *Determinación de la eficiencia de la lenteja de agua (Lemna minor) en la descontaminación de las aguas del río turbio*. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela. [http://bibagr.ucla.edu.ve/cgi-win/be\\_alex.exe?Autor=Virgüez,+V%EDctor&Nombrebd=bvetucla](http://bibagr.ucla.edu.ve/cgi-win/be_alex.exe?Autor=Virgüez,+V%EDctor&Nombrebd=bvetucla). Fecha de consulta: 20 de octubre de 2010
- Wang, T.C.; Weissman, J.C.; Ramesh, G.; Benemann, J.R. (1996); *Parameters for removal of toxic heavy metals by water milfoil (Myriophyllum spicatum)*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*: 57, 779-786.
- Wollenberg J.L.; Peters S.C. (2009); *Diminished mercury emission from waters with duckweed cover*. *Journal of Geophysical Research*: 114, 10-29.

