



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Evaluación de *Salvinia minima* Baker como
potencial acumuladora de Cu y Zn de agua residual
porcina: efectos fisiológicos, morfológicos y de
crecimiento**

Tesis que presenta

Gerardo Alfonso Carrillo Niquete

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Recursos Naturales)

Mérida, Yucatán, México

2017

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Gerardo Alfonso Carrillo Niquete "Evaluación de *Salvinia minima* Baker como potencial acumuladora de Cu y Zn de agua residual porcina: efectos fisiológicos, morfológicos y de crecimiento "fue realizado en las Unidades de Recursos Naturales y de Biotecnología, en los laboratorios de Fisiología Ecológica y Fisiología Vegetal Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. José Luis Andrade Torres y el Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, dentro de la opción de Recursos Naturales , perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 8 de mayo de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Gerardo Alfonso Carrillo Niquete

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Recursos Naturales y la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. José Luis Andrade Torres y el Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández durante los años 2015 y 2016.

AGRADECIMIENTOS

- Al CONACyT, por la beca otorgada.
- Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por la facilidad brindada para el uso de las instalaciones, equipos y reactivos.
- A mis directores de tesis y al comité revisor: Dr. José Luis Andrade, al Dr. Jorge M. Santamaría Fernández, Dr. Víctor Cobos Gasca, Dra. Laura Hernández Terrones, y Dra. Casandra Reyes García. Gracias por la confianza y asesoría brindada a lo largo del posgrado.
- A la Dra. Gabriela Fuentes Ortiz, por su amistad, constante disposición en el apoyo, así como sus comentarios y observaciones durante mis estudios. Gracias.
- A la Unidad de Recursos Naturales, de Biotecnología y Bioquímica, por todo el apoyo prestado en la etapa de experimentación, especialmente a los técnicos Ing. Roberth Us Santamaría, M. en C. Francisco Espadas y Gil, M. en C. Carlos Talavera May, Biól. María Rosalina Rodríguez Román, Q.F.B. Matilde Ortiz García, Biól. Verónica Limones Briones y José Luis Simá Gómez.
- Al personal técnico del área de Viveros, por las facilidades otorgadas en cuanto a material y espacios.
- Al Dr. Héctor Estrada Medina y M. en C. Mariana López Díaz, por su apoyo y facilidades en el Laboratorio de Plantas, Suelo y Agua del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias- UADY.
- Al Dr. Manuel Martínez Estévez y M. en C. María de Fátima Medina Lara de la Unidad de Bioquímica del CICY por las amenidades en el uso del espectrofotómetro de absorción atómica.

- Al todo el personal técnico de la Unidad Porcícola del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias en especial al Dr. Pedro Chimal y al secretario administrativo, M. en C. José Enrique Abreu Sierra.
- Al Biol. Daniel Jiménez, Ing. en Biotecnología Abelardo Jiménez y al Ing. en Restauración Forestal Julio Salas, por el incondicional apoyo durante la etapa experimental.

DEDICATORIAS

- A mi esposa, Rocío Acosta, quien con su amor, paciencia y comprensión me impulsa siempre a dar lo mejor de mí y alentarme a salir adelante. Te amo.
 - A mi familia; especialmente a mis padres y hermanos, quienes contribuyeron en gran medida a formar lo que actualmente soy. A mis segundos padres, los Sres. José Enrique Niquete Cervera y Wilberth Mena (D.E.P) y las Sras. Suemy Lugo Hernández y Addy Yolanda Aguilar, por otorgarme más de lo que pudieron dar en todo momento, y ayudarme a alcanzar una meta más en la vida.
 - A mis amigos y compañeros de la Unidad de Recursos Naturales y Biotecnología; por todos aquellos momentos de alegría y momentos difíciles que compartimos y por sus valiosas opiniones en la realización del presente, así como Gracias por todo.
 - Al personal técnico de la Unidad de Recursos Naturales; Ing. Roberth Us y José Luis Simá Gómez, así como también al personal técnico de la Unidad de Biotecnología, M en C. Francisco Espadas y Gil y M. en C. Carlos Talavera May, por su amistad, el valioso tiempo dedicado en el laboratorio y por contribuir de manera importante en la realización de este trabajo. Gracias por su apoyo.
-

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I- ANTECEDENTES	3
1.1- La contaminación del agua por metales pesados.....	3
1.2- Efectos de los metales pesados sobre la salud.....	4
1.3- Problemática de los metales pesados en actividades agropecuarias	5
1.4- El agua residual porcina.....	6
1.5- Uso de Cu y Zn en la porcicultura	7
1.6- Problemática ambiental sobre el agua residual porcina.....	9
1.7- Tratamiento de aguas residuales porcinas.....	10
1.8- El uso de plantas acuáticas como tratamiento de aguas residuales porcinas: Humedales artificiales.....	11
1.9- Fitorremediación de metales pesados empleando plantas acuáticas	12
1.10- Salvinia como planta hiperacumuladora de metales pesados.....	14
1.11- Funciones del Cu y Zn en plantas.....	16
Justificación	21
Preguntas de investigación	22
Hipótesis	22
Objetivo general	22

Objetivos particulares	23
CAPITULO II- MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1- Acumulación de Cu y Zn de <i>S. minima</i> ante la exposición a diferentes concentraciones CuSO₄ y ZnSO₄: efectos fisiológicos y de crecimiento.	24
2.1.1- Recolecta de <i>Salvinia minima</i> Baker ecotipo Yucatán.	24
2.1.2- Aclimatación de las plantas al sitio del experimento	25
2.1.3- Diseño de exposición de plantas a los tratamientos con Cu y Zn.....	25
2.1.4- Determinación de metales pesados en hojas y raíces de <i>S.minima</i>	26
2.1.5- Factor de Bioconcentración (FBC) y Factor de Translocación (FT).....	28
2.1.6- Evidencia fotográfica de la exposición de las plantas de <i>S. minima</i> a Cu y Zn y al agua residual porcina	28
2.1.7- Número de hojas, longitud de las raíces y mortalidad de las plantas	28
2.1.8- Biomasa y tasa de crecimiento relativa.....	29
2.1.9- Fluorescencia de la clorofila en <i>S. minima</i> (Fv/Fm).....	29
2.1.10- Cuantificación de fuga de electrolitos en <i>S. minima</i>	30
2.2. Efectos fisiológicos, de crecimiento y acumulación de Cu y Zn de <i>S. minima</i> ante la exposición a diferentes concentraciones de agua residual porcina”	31
2.2.1- Caracterización del agua residual porcina	31
2.2.2- Medición de la temperatura, pH, conductividad eléctrica y contenido de oxígeno disuelto.....	32
2.2.3- Medición de amonio.....	32
2.2.4- Medición de nitratos.....	33

2.2.5-	Determinación de Cu y Zn en agua residual porcina.....	33
2.2.6-	Exposición de las plantas a tratamientos con agua residual porcina (ARP)	34
2.2.7-	Determinación de cobre y zinc en tejidos de <i>S. minima</i> expuesta a tratamientos con aguas residuales porcinas	36
2.2.8-	Crecimiento de <i>S. minima</i> expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina: número de hojas, longitud de las raíces, mortalidad de las plantas, biomasa y tasa de crecimiento relativo.	37
2.2.9-	Respuestas fisiológicas de <i>S. minima</i> expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina: Fv/Fm y fuga de electrolitos	37
2.2.10-	Presentación e interpretación de los resultados	37
CAPITULO III- RESULTADOS Y DISCUSION		38
3.1-	Acumulación de Cu y Zn de <i>S. minima</i> ante la exposición a diferentes concentraciones CuSO₄ y ZnSO₄: efectos fisiológicos y de crecimiento”	38
3.1.1-	Contenido de cobre en hojas y raíces.....	38
3.1.2-	Contenido de zinc en hojas y raíces.....	40
3.1.3-	Factores de bioconcentración y de translocación.....	41
3.1.4-	Aspecto físico de las plantas expuestas a cobre.....	42
3.1.5-	Aspecto físico de las plantas expuestas a zinc	44
3.1.6-	Número de hojas en plantas expuestas a cobre	45
3.1.7-	Número de Hojas en plantas expuestas a zinc	46
3.1.8-	Mortalidad de hojas en plantas expuestas a cobre	46
3.1.9-	Mortalidad de hojas en plantas expuestas a zinc.....	47

3.1.10- Longitud de las raíces de plantas expuestas a cobre.....	48
3.1.11- Longitud de las raíces de plantas expuestas a zinc	48
3.1.12- Bimasa de plantas expuestas a cobre	49
3.1.13- Biomasa de plantas expuestas a zinc	50
3.1.14- Tasa de crecimiento relativo en plantas expuestas a cobre	52
3.1.15- Tasa de crecimiento relativo en plantas expuestas a zinc.....	53
3.1.16 Fluorescencia de clorofila en plantas expuestas a cobre	54
3.1.17- Fluorescencia de clorofila en plantas expuestas a zinc.....	55
3.1.18- Fuga de electrolitos en plantas expuestas a cobre	56
3.1.19- Fuga de electrolitos en plantas a expuestas a zinc	58
DISCUSION DE LA SECCIÓN 3.1	60
CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN I	69
3.2 Efectos fisiológicos, de crecimiento y acumulación de Cu y Zn de S. minima ante la exposición a diferentes concentraciones de agua residual porcina.....	72
3.2.1- Caracterización del agua residual porcina	72
3.2.2- Contenido de cobre en hojas y raices	74
3.2.3- Contenido de zinc en hojas y raices.....	77
3.2.4- Aspecto físico de las plantas expuestas a diluciones de agua residual porcina (de 25% al 100%)	79
3.2.5- Aspecto físico de las plantas expuestas a diluciones de agua residual porcina (de 10% al 25%)	80

3.2.6- Número de hojas	81
3.2.7- Mortalidad de las hojas	82
3.2.8- Longitud de raíces	83
3.2.9- Biomasa de plantas	84
3.2.10- Tasa de crecimiento relativo	86
3.2.11- Fluorescencia de clorofila	86
3.2.12- Fuga de electrolitos	87
DISCUSIÓN DE LA SECCIÓN 3.2	90
CONCLUSIONES DE LA SECCION 3.2	103
CONCLUSIONES GENERALES	106
PERSPECTIVAS	107
BIBLIOGRAFIA	109

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1- Morfología de <i>S. minima</i> Baker. A) Planta completa; B) Tricomas en la epidermis de las hojas; C) Hojas con tricomas.....	14
Figura 2.1- Plantas de <i>S. minima</i> aclimatadas, que fueron utilizadas para la experimentación	24
Figura 2.2- Descripción del diseño experimental empleado para los ensayos de <i>S. minima</i> en CuSO_4 y en ZnSO_4	26
Figura 2.3- Cárcamo recolector de agua residual generada en la Unidad Porcícola del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, de la Universidad Autónoma de Yucatán.....	32
Figura 2.4 Descripción del diseño experimental seguido para los ensayos de <i>S. minima</i> en agua residual porcina (del 10% al 25%).....	36
Figura 3.1.1 Contenido de Cu en plantas de <i>S. minima</i> expuesta a concentraciones crecientes de CuSO_4 (0- control, 20, 40 y 80 μM).....	40
Figura 3.1.2 Contenido de Zn en plantas de <i>S. minima</i> expuesta a concentraciones de ZnSO_4 (0- control, 20, 40 y 80 μM)	41
Figura 3.1.3 Factor de Bioconcentración (FBC) y Factor de Translocación (FT) de <i>S. minima</i> expuesta a tres concentraciones de CuSO_4 y tres concentraciones de ZnSO_4	43
Figura 3.1.4 Aspecto físico de plantas de <i>S. minima</i> después de exposición, durante 4 días, a diferentes dosis de CuSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM).....	44
Figura 3.1.5 Exposición de <i>S. minima</i> durante 4 días a diferentes concentraciones de ZnSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM).	45

Figura 3.1.6 Número de hojas de <i>S. minima</i> expuesta durante cuatro días a diferentes concentraciones de CuSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM)	46
Figura 3.1.7 Número de hojas de <i>S. minima</i> expuesta durante cuatro días a diferentes concentraciones de ZnSO_4	47
Figura 3.1.8 Porcentaje de mortalidad de <i>S. minima</i> expuesta durante tres días a diferentes concentraciones de CuSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM).....	48
Figura 3.1.9 Porcentaje de mortalidad de <i>S. minima</i> expuesta durante tres días a diferentes concentraciones de ZnSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM).....	49
Figura 3.1.10 Biomasa (peso seco) de plantas de <i>S. minima</i> expuestas a diferentes concentraciones de CuSO_4 (20, 40 y 80 μM).....	50
Figura 3.1.11 Biomasa (peso seco) de plantas de <i>S. minima</i> expuestas a diferentes concentraciones de ZnSO_4 (20, 40 y 80 μM).....	52
Figura 3.1.12 Tasa de crecimiento relativa de <i>S. minima</i> expuesta a tres concentraciones de CuSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM).....	53
Figura 3.1.13 Tasa de crecimiento relativa de <i>S. minima</i> expuesta a tres concentraciones de ZnSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM)	54
Figura 3.1.14 Eficiencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m) de <i>S. minima</i> expuesta a diferentes concentraciones de CuSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM)	55
Figura 3.1.15 Fluorescencia de la clorofila (F_v/F_m) de <i>S. minima</i> expuesta a diferentes concentraciones de ZnSO_4	56
Figura 3.1.16 Fuga de electrolitos en <i>S. minima</i> expuesta a CuSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM)	58
Figura 3.1.17 Fuga de electrolitos en plantas de <i>S. minima</i> expuesta a ZnSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM).....	60

Figura 3.2.1a- pH, oxígeno disuelto y conductividad eléctrica del agua residual porcina generada durante la semana de muestreo (del 3 al 11 de febrero de 2016)..	74
Figura 3.2.1b- Contenido de: amonio A), nitratos B), C) Cu y D) Zn, en agua residual porcina generada durante la semana de muestreo (del 3 al 11 de febrero de 2016).	75
Figura 3.2.2 Contenido de Cu en <i>S. minima</i> expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina (10,15, 20 y 25%).....	77
Figura 3.2.2 Contenido de Zn en <i>S. minima</i> expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina (10,15, 20 y 25%).....	79
Figura 3.2.4 Exposición de <i>S. minima</i> a diferentes porcentajes de agua residual porcina (25, 50, 75 y 100%) y tratamiento control -medio nutritivo de Hoffmann (2004)- durante 4 días.....	81
Figura 3.2.5 Aspecto de plantas de <i>S. minima</i> expuestas durante 4 días a diferentes porcentajes de agua residual porcina. (10%,15%,20% y 25%) y dos tratamientos control: agua destilada y solución nutritiva de Hoffmann.....	82
Figura 3.2.6 Número de hojas en plantas de <i>S. minima</i> expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina (10%, 15%, 20% y 25%) durante 4 días..	83
Figura 3.2.7 Tasa de mortalidad de <i>S. minima</i> a diferentes porcentajes de agua residual porcina (10%, 15% 20% y 25%) y dos tratamientos control:..	84
Figura 3.2.8 Longitud final de raíces de <i>S. minima</i> expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina (10%, 15%, 20% y 25%) durante 4 días.....	85
Figura 3.2.9 Biomasa (peso seco) de hojas de plantas de <i>S. minima</i> expuestas a diferentes concentraciones de agua residual porcina (10%, 15%, 20% y 25%)..	86

Figura 3.2.10 Tasa de Crecimiento relativa de <i>S. minima</i> en agua residual porcina (del 10 al 25% de su concentración original), durante 4 días de exposición... ..	87
Figura 3.2.11 Fluorescencia de la clorofila (F_v/F_m) de <i>S. minima</i> expuesta a diferentes concentraciones de agua residual (10%, 15%, 20% y 25%) y en agua destilada como control durante 4 días.	88
Figura 3.2.12 Fuga de electrolitos en <i>S. minima</i> expuesta a 10%, 15%, 20% y 25% de agua residual porcina.....	90

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Principales metales pesados empleados en actividades y procesos antropogénicos.....	4
Cuadro 1.2 Principales efectos de algunos metales pesados sobre la salud humana.....	5
Cuadro 1.3 Agua residual promedio generada por tamaño de granja.	7
Cuadro 1.4 Dosis recomendadas de cobre y zinc en cerdos.....	8
Cuadro 1.5 Características del agua residual porcina en diversos estudios	9
Cuadro 1.6 Mecanismos de depuración predominantes en humedales artificiales.....	12
Cuadro 1.7 Principales plantas acuáticas empleadas en la fitorremediación y las concentraciones máximas alcanzadas.....	13
Cuadro 1.8 Ejemplos de especies del género <i>Salvinia</i> y su utilidad en la toma de metales pesados.....	15
Cuadro 1.9 Algunas enzimas que contienen cobre, y su función.....	16
Cuadro 1.10 Algunas enzimas que contienen zinc, y su función.....	18
Cuadro 2. 1 Condiciones ambientales del vivero no. 5, donde se crecieron las plantas y donde se realizaron los experimentos.....	25
Cuadro 2.2 Factores de dilución empleados en la cuantificación de Cu y Zn en muestras digeridas mediante método de digestión ácida....	27
Cuadro 2.3 Descripción de los tratamientos empleados con agua residual porcina... ..	34

Cuadro 2.4 Características fisicoquímicas y contenido de NH ₄ NO ₃ , Cu y Zn de los tratamientos con aguas residuales porcinas diluidas (del 10% al 25% de su concentración original).....	35
Cuadro 2.5 Factores de dilución empleados en la cuantificación de Cu y Zn en tejidos de plantas expuestas a aguas residuales porcinas (ARP10 a ARP25)....	37
Cuadro 3.2.1 Valores promedio de las condiciones fisicoquímicas del agua residual porcina, obtenidas durante el periodo de recolecta (del 3 al 11 de febrero de 2016) de la Unidad Porcícola del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CCBA—UADY) y de la solución nutritiva de Hoffmann <i>et al.</i> (2004)...	73
Cuadro 3.2.2 Cuadro comparativo con los valores obtenidos en el agua residual porcina en diversos trabajos con los resultados de aguas residuales porcinas obtenidos en este estudio.....	91

ABREVIATURAS

ARP: Agua residual porcina

C1: Tratamiento control con agua destilada.

C2: Tratamiento control con solución de Hoffmann (2004)

ARP10: Agua residual porcina al 10%

ARP15: Agua residual porcina al 15%

ARP20: Agua residual porcina al 20%

ARP25: Agua residual porcina al 25%

mg/L: miligramos por litro

μ L: microlitros

mg/g día: miligramos por gramo por día

ppm: Partes por millón.

mM. milimolar

μ M: micromolar

mol/m² día: moles por metro cuadrado por día

h: Potencial hídrico

D. P. V: Déficit de presión de vapor.

CuSO₄: Sulfato de cobre

ZnSO₄. Sulfato de zinc

mg Cu/ g PS: miligramos de Cu por gramo de biomasa (en peso seco)

mg Zn/ g PS: miligramos de Zn por gramo de biomasa (en peso seco)

F₀= fluorescencia inicial

F_m= fluorescencia máxima

F_v/F_m: Fluorescencia variable / fluorescencia máxima.

M.D.A.: malonaldehído

U.P.A: Unidad de Producción Animal

RESUMEN

En la porcicultura se emplean grandes volúmenes de agua para el aseo de los animales, además de suplementos alimenticios enriquecidos con minerales, tales como cobre y zinc (Cu y Zn) para alcanzar un óptimo desarrollo de la producción. Dada a esta situación y al manejo inadecuado que reciben las aguas residuales porcinas, se considera esta descarga como un riesgo de contaminación, tanto orgánica como inorgánica para el ambiente. El cobre y el zinc se encuentran presentes en el agua residual porcina y suponen riesgos para la salud del ecosistema y de los seres vivos, dado a su toxicidad, persistencia en el ambiente y a que presentan bioacumulación y biomagnificación. La fitorremediación (uso de plantas con fines descontaminantes) ha tomado importancia internacional en las últimas décadas, por ser ambientalmente pertinente, y poseer un relativo bajo costo económico *versus* métodos convencionales de remediación. El presente trabajo consistió en una evaluación del potencial de *Salvinia minima* Baker en la acumulación de Cu y Zn bajo tres concentraciones experimentales (20, 40 y 80 μM de CuSO_4 y ZnSO_4 , por separado) y cuatro concentraciones de aguas residuales porcinas (del 10 al 25% de su concentración), así como una estimación del estrés producido en las plantas expuestas (crecimiento, eficiencia fotosintética y fuga de electrolitos). Los resultados indican que bajo concentraciones experimentales, las plantas acumularon ambos metales (6.96 mg Cu/ g PS y 19.6 mg Zn/ g PS), siendo la raíz el principal tejido de acumulación; se registraron afectaciones sobre la fisiología de la planta que fueron dosis-dependientes. Por otra parte, las plantas expuestas a los tratamientos con aguas residuales porcinas acumularon 0.27 mg Cu / g PS y 0.76 mg Zn/ g PS como máximo, y mostraron un aumento de biomasa, acompañado de modificaciones a nivel fisiológico y morfológico que indicarían un posible combinación de factores estresantes (presencia de microorganismos, bajo oxígeno disuelto y alta conductividad eléctrica) más que estrés por acumulación de Cu y Zn.

ABSTRACT

In the swine industry, large quantities of water and mineral supplementation (copper and zinc, mainly) are needed for livestock washing and to ensure optimal development of the production. However, the wastewater resulting from this activity represents a source of both organic and inorganic contamination. High levels of Cu and Zn pose toxicity risks in every form of life due to biomagnification and bioaccumulation processes. Phytoremediation has taken worldwide acceptance in the last decades because it's an environmental friendly technology and it's low-cost operation (compared with other conventional methods in environmental clean-up). The aim of this study was to assess the bioaccumulation potential of Cu and Zn from *Salvinia minima* Baker, an aquatic fern with local range distribution under three experimental concentrations of Cu and Zn compounds (20, 40 and 80 μM of CuSO_4 and ZnSO_4 , separately) and four concentrations of swine wastewater (from 10 to 25 % of its original concentration) from a local pig farm. We performed a physiological evaluation of the stress produced by the plant's exposure to the treatments (quantum yield Fv/Fm, electrolyte leakage and growth responses). Our findings suggests that *S. minima* accumulated 6.96 mg Cu / DW g and 19.6 mg Zn / DW g (whole plant basis) under experimental concentrations, mostly in roots rather than fronds. We observed physiological modifications in studied variables that were dose- dependent (higher stress response at higher doses of metals). On the other hand, *S. minima* showed an increment of biomass when exposed to swine wastewater treatments, with an accumulation potential of 0.27 and 0.76 mg/ g DW (in whole plant basis) of Cu and Zn, respectively, and physiological and morphological modifications in Fv/Fm and electrolyte leakage suggesting that a combination of stress factors (such as damage caused by microorganism, low oxygen levels and high electrical conductance in media) more than heavy metal's induced stress.

INTRODUCCIÓN

El estado de Yucatán ocupa el tercer lugar en producción de carne de puerco a nivel nacional, con una producción anual de 128,979 toneladas al año y con 470 granjas porcícolas registradas ante la SAGARPA (Cortés-Esquivel, 2012). Sin embargo, el manejo que se ha dado a los animales y a las aguas residuales generadas en este sector ha sido perjudicial en términos ecológicos y sanitarios, debido al escaso o nulo tratamiento de las aguas residuales y a su inadecuada disposición final. Se ha estimado que en Yucatán se generan sólidos en un promedio de 3,385 toneladas, y entre 9,428 a 16,700 m³ de aguas residuales (Cortés-Esquivel, .2012), y que el 63% de las aguas residuales porcinas no recibe ningún tratamiento (Drucker, 2004).

La península de Yucatán ha sido declarada como una región vulnerable a la descarga de aguas residuales, y a la contaminación de agua subterránea de la que depende casi toda la población (Drucker, 2004). El efecto negativo del agua residual porcícola se debe a que posee altas concentraciones de patógenos, materia orgánica y metales pesados, tales como cobre y zinc (Cu y Zn) que son usados como suplementos minerales para que los porcinos tengan un estado nutricional óptimo y alcancen un desarrollo pleno en cada etapa de su desarrollo. A pesar de que existen métodos para el tratamiento de aguas contaminadas, resulta necesario investigar y expandir el conocimiento acerca de nuevas tecnologías que puedan ser incluidas en el tratamiento convencional de las aguas residuales. En este sentido, la fitorremediación es una tecnología prometedora que aprovecha la capacidad de las plantas para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el agua, aire y suelo (Delgadillo – López, 2011). Las plantas acuáticas han llamado la atención los últimos años debido a que son capaces de acumular metales pesados que toman del ambiente y a su efecto acumulativo, ya que la concentración final del elemento suele ser mayor en la planta que en la columna de agua y por su rápida tasa de crecimiento (Dhir, 2013). Entre las plantas que han sido empleadas destaca el helecho *Salvinia minima* Baker, la cual ha demostrado ser eficaz en acumular elementos metálicos en sus tejidos, una amplia tolerancia a diversos metales pesados, y de poseer algunas características idóneas para la fitorremediación (rápida tasa de crecimiento, y facilidad en su recolección y disposición final) (Dhir, 2013).

A la fecha, el estudio de los contaminantes inorgánicos presentes en el agua residual porcina generada en la entidad ha recibido poca atención, con solo algunos trabajos publicados. Ligado a ello, y a la importancia del sector porcícola en Yucatán, resultan necesarios más estudios de este tipo. Adicionalmente, el estudio de las respuestas fisiológicas de las plantas en aplicaciones de biorremediación, sobre todo en condiciones de campo es necesario dado a que permite obtener información sobre el desempeño, mecanismos de tolerancia y estrés producido en los vegetales; lo que conduce a obtener una decisión fundamentada sobre la pertinencia de su futura aplicación en esta tecnología en nuestra región

CAPITULO I- ANTECEDENTES

1.1- La contaminación del agua por metales pesados

El agua es un recurso necesario para todas las actividades que desempeña el ser humano, y es de vital importancia conservarlo en calidad y en cantidad, dado a que no se conoce otro líquido o sustancia que pueda sustituirlo. De acuerdo con el Reporte Mundial del Desarrollo del Agua de las Naciones Unidas en 2003, a pesar de que el 70% del planeta está cubierto con agua, únicamente el 2.5% es agua dulce y un 0.3% de esta agua es apta para el consumo humano. Debido a que todas las actividades humanas requieren este líquido, se considera un recurso que fácilmente puede alterarse, y es vulnerable a cualquier alteración de sus propiedades naturales. Dentro de los contaminantes que más han llamado la atención se encuentran los metales pesados, que son un grupo de aproximadamente 30 elementos, entre metales y metaloides, cuya densidad es mayor a 4 o 5 veces la densidad del agua (1 g/cm^3) y que son tóxicos para los sistemas vivos aun en bajas concentraciones (Chiarelli, 2014).

Dentro de la legislación mexicana, (NOM-001-SEMARNAT-1996) se reconocen como “metales pesados” los siguientes elementos: arsénico, cadmio, cobre, cromo, mercurio, níquel, plomo, zinc y cianuros. Estos elementos se encuentran en la naturaleza (en la corteza terrestre) y debido a que no pueden ser destruidos ni degradados por el ambiente, se considera que son contaminantes persistentes que pueden ingresar a los seres vivos y acumularse en los tejidos (bioacumulación) y presentan un efecto de biomagnificación, en la cual las concentraciones de estos contaminantes aumentan con la cadena trófica y presentan efectos perjudiciales en los últimos eslabones de las redes tróficas. (Singh *et al.*, 2011)

La emisión de metales pesados al ambiente puede darse de forma natural y antropogénica, siendo la aportación por causas antropogénicas la mayor en cuanto a concentración y frecuencia se refiere. En el Cuadro 1.1 se incluyen las principales fuentes de emisiones de metales pesados por causas antropogénicas.

Cuadro 1.1 Principales metales pesados empleados por actividades y procesos antropogénicos (Domeech y Peral, 2006).

Actividad o proceso	Metales aportados
Extracción de minerales	As, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn
Fundición de metales	As, Cd, Pb y Ti
Metalúrgica	Cr, Cu, Mn, Pb, Sb y Zn
Electrónica, química de pinturas, producción de plásticos, soldadura.	Cu, Sn, Cr, Cd, Ni, Pt, Ru, Pd, As, Sb, Se, Mo y Zn
Corrosión metálica de residuos urbanos	Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn
Gestión metálica	Cu, Fe, Pb, Ni, Co, Cr, Cd y Zn
Agricultura y ganadería	Cu, Zn, As, Mn y Pb
Quema de combustibles fósiles	Cd, Zn, As, Sb, Se, Cu, Mn y V

1.2- Efectos de los metales pesados sobre la salud

Los metales pesados se han convertido en una preocupación mundial, debido a los efectos negativos sobre los seres vivos aun en bajas concentraciones y al rápido incremento de las concentraciones en los cuerpos de agua naturales. Estos elementos no se degradan y tienden a acumularse en los organismos y en el ambiente, causando numerosas enfermedades y trastornos, por lo que han sido catalogados como una clase emergente de cancerígenos humanos (Farajzadeh y Monji, 2004). En el Cuadro 1.2, se resumen las principales afecciones de salud que se han atribuido a los metales pesados.

Cuadro 1.2 Principales efectos de algunos metales pesados sobre la salud humana (Marin y Griswold, 2009 y WHO, 2003).

Elemento	Efectos sobre la salud	Limites (EPA y FDA, 2009)
As	Cancerígeno; náuseas, vómitos, leucopenia y eritrocitopenia, bradicardia	0.01 mg/L
Ba	Vómitos, diarrea, calambres, anomalías en la presión sanguínea, debilidad muscular.	2.0 mg/L.
Cd	Dolor de cabeza, daño hepático, renal, pulmonar, óseo y fuerte irritación estomacal.	0.005 mg/L
Pb	Cancerígeno, daño nervioso, debilidad muscular, función motriz disminuida, anemia.	15.0 µg/L
Cu	Problemas gastrointestinales, daño hepático y renal	1.3 mg/L
Zn	Molestias estomacales, náuseas; no se conocen los efectos tóxicos a largo plazo.	WHO (2003) Zn= de 15 a 22 mg/día.
Cr	Cancerígeno, irritación de las mucosas y de la piel, daño hepático, nervioso y renal.	0.1 mg/L
Hg	Cancerígeno, daño nervioso, irritabilidad, calambres, vómitos, mareos, taquicardia.	2.0 µg/L

1.3- Problemática de los metales pesados en actividades agropecuarias

El Cu y el Zn son elementos importantes en la industria pecuaria de Yucatán, porque son utilizados como agente fungistático y como promotores del crecimiento. (Cortés- Esquivel, 2012), los alimentos empleados para la alimentación de ganado porcino se encuentra adicionados con estos elementos, y las agua porcinas pueden poseer altas

concentraciones de cobre y zinc debido a que se ha calculado que gran parte del alimento (75%) es considerado como desperdicio al final de la jornada laboral (Drucker, 2004).

A pesar de que el Cu y Zn son necesarios para el desarrollo de los animales, en concentraciones elevadas pueden provocar contaminación de la carne e intoxicación en los animales (Cortés- Esquivel., 2012). Tal es el caso de la cerdaza y pollinaza (aditivos alimenticios a base de estiércol de aves y porcinos) los cuales cada vez caen más en desuso por poseer concentraciones peligrosas de cobre (la cerdaza posee de 300 a 700 ppm de Cu). Hasta la fecha, son pocos los estudios que incluyen el contenido de metales pesados presentes en el agua residual generadas en Yucatán. En un estudio realizado por Cortés–Esquivel (2012), se encontró que la máxima concentración de cobre y zinc en aguas residuales porcinas puede alcanzar los 5.03 mg/L de cobre y hasta 327.57 mg/L de zinc, aunque este valor depende diversos factores: el tamaño de la granja, la densidad de animales, la cantidad de agua empleada para la limpieza, y el manejo, entre otras cosas.

1.4- El agua residual porcina

El agua no solo provee hidratación a los animales, sino que ayuda a regular la temperatura de los cerdos y se utiliza para lavar los corrales mediante el lavado a chorro. La generación de aguas residuales porcinas resulta del proceso de limpieza de los corrales y este desperdicio está constituido por una mezcla de excretas (orina y heces fecales), alimento y agua no consumidos por los animales, partículas del suelo, entre otras partículas (Taiganides *et al.*, 1996). En cuanto al uso de agua, Drucker *et al.*, (2004) señalan que la cantidad de agua empleada para la limpieza de los corrales puede ser variable, oscilando entre 17 a 62 litros de agua por cada unidad de peso de animal (1 UPA = 100 kg), lo cual depende del tamaño de la granja, la cantidad de animales que se crían, su edad, (si son lactantes, juveniles, de engorda o reproductores), y del plan de manejo de la granja, entre otros factores. En el Cuadro 1.3, se presenta información sobre la generación de agua residual porcina por número de animales en crianza.

Cuadro 1.3 Agua residual promedio generada por tamaño de granja (Modificado de Drucker *et al.*, 2004 y Garzón y Zúñiga, 2014)

Estrato	Número de cerdos	Agua residual total generada/ UPA/ día (litros)
Pequeño	< 2,500	35
Mediano	2,500 – 7,999	13
Grande	>8,000	16

Drucker *et al.*, 2004 realizaron una estimación de la generación de aguas residuales dependiendo de la extensión de las granjas porcinas del Estado y encontraron que las granjas pequeñas suelen ser quienes más agua utilizan para labores de limpieza, debido a que en la mayoría de las veces carecen de instrumentos para medir el volumen de agua empleado y a la falta de un plan de manejo adecuado, ya que basan su operación en planes de manejo tradicionales, los cuales han perdurado a través de generaciones y permanecen en el conocimiento popular.

1.5- Uso de Cu y Zn en la porcicultura

Dentro de la industria agropecuaria, el cobre y el zinc son empleados como promotores del crecimiento en los animales, y administrado en dosis adecuadas junto con antibióticos, permiten fortalecer el sistema inmunológico. Sin embargo, es necesario conocer los requerimientos de estos minerales dependiendo de la etapa de vida del animal, ya que tanto la deficiencia como el abuso pueden conllevar a alteraciones y enfermedades metabólicas:

Cobre: Su principales funciones son la síntesis de hemoglobina, producción y activación de enzimas oxidativas involucradas en el transporte y metabolismo del hierro, formación de glóbulos rojos y activación del sistema inmune (Lee, *et al.*,1968). Las necesidades de cobre varían dependiendo de la edad y del peso del animal (Cuadro 1.4). La deficiencia de cobre conlleva a una pobre movilización de hierro, lo que puede ocasionar anemia. Algunos de sus síntomas son el arqueamiento de las extremidades anteriores y posteriores, fragilidad en los huesos y fracturas espontáneas (Bettger, 1989). Por otro lado, el umbral de toxicidad del Cu va desde 100 a 250 ppm en la alimentación, la

CAPITULO I- ANTECEDENTES

cual está caracterizada por los siguientes síntomas: disnea, anemia o ictericia generalizada, pérdida de apetito, intensa sed, debilidad del tren posterior, espasmos musculares y gran excitabilidad, heces negras y puede observarse hemoglobinuria.

Zinc: Este elemento participa como cofactor de las enzimas alcohol deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, colagenasa y superóxido dismutasa, y en procesos del metabolismo del retinol (vitamina A), y de ácidos grasos. Otras funciones en el organismo son la función estructural de las membranas de los eritrocitos, y ayudar en la producción y maduración espermática (Bikker, 2011). Los requerimientos de este mineral son dependientes de la etapa de vida del porcino, siendo mayor su uso en lactantes y lechones (Quiles, 2009; Jacela, 2010).

La deficiencia de zinc en las primeras etapas de vida, provoca pérdida de apetito y por ende, poca ganancia de peso y retraso en el desarrollo. Si el déficit de Zn se prolonga, puede afectar órganos como el hígado, páncreas y la piel, provocando lesiones epiteliales causadas por deficiencia en la asimilación de vitamina A (paraqueratosis) (Quiles, 2009). En cuanto a la toxicidad en cerdos por zinc existe un amplio rango de tolerancia: Brink *et al.*, (1959) determinaron que ingestas de 1 g de Zn/kg de masa seca en forma de carbonato no producían ninguna alteración en lechones en transición, mientras que dosis de 4-8 g de Zn/kg de masa seca resultaron en un incremento de la mortalidad.

Cuadro 1.4 Dosis recomendadas de cobre y zinc en cerdos. (Jacela *et al*, 2010).

Peso del animal	Cobre (ppm)	Zinc (ppm)
Menor a 11 libras	5	3000
11 a 15 libras	5	3000
15 a 25 libras	5	2000
25 a 50 libras	100 a 250	50
Engorda (50 a 120 libras)	50 a 100	50
Peso comercial (de 120 libras en adelante)	5	50

1.6- Problemática ambiental sobre el agua residual porcina

La calidad del agua residual porcina depende en gran medida del manejo, al número de animales que se encuentran en crianza, de los regímenes de limpieza y al volumen de agua empleado para esta labor. Cuando no se sigue un plan de manejo adecuado, es común que algunos de valores fisicoquímicos del agua residual generados se encuentren por encima de la normatividad vigente en materia ambiental. En el Cuadro 1.5 se resumen algunos de los parámetros fisicoquímicos del agua residual porcina de varios estudios de caracterización de aguas residuales porcinas

Cuadro 1.5 Características del agua residual porcina en diversos estudios (modificado de Cortés-Esquivel, 2012).

Parámetro	Lansing, et al., 2008	Soria, et al., 2001	Trejo et al., 2014	Garzón y Zuñiga, 2014
Ph	6.7	7.6	7.4	7.3
Temp (°C)	25.7	26.3	31	--
DQO (mg/L)	--	543	1945	6092
DBO (mg/L)	2180	--	9768	42500
Sólidos totales (mg/L)	1390	--	6842	32500
N Kjeldahl (mg/L)	231	--	790	1666
P Total (mg/L)	30.7	179	204	97.6

En México, se estima que el 28% del total de aguas porcinas generadas son descargadas en cuerpos de agua naturales o directamente al suelo (Garzón- Zúñiga, 2008) y en el caso de Yucatán, cerca del 63% del agua residual porcina generada es desechada sin recibir ningún tratamiento (Cortés-Esquivel, 2012). Estas prácticas suceden con mayor frecuencia en granjas pequeñas o medianas, dado a que son aquellas

que poseen infraestructura sin tecnologías de ahorro de agua y carecen de planes de manejo adecuados y regulados conforme a la legislación ambiental vigente (Drucker, *et al.*, 2004). A nivel mundial, se reconocen que la porcicultura trae consigo los siguientes problemas ambientales (Pérez –Espejo, 2002):

- Mal olor y emisiones de gases como CO₂, CH₄, NH₃, y H₂S que afectan a los pobladores que viven en sitios cercanos a las producciones
- Contaminación microbiológica del agua superficial y subterránea por descarga directa o por infiltración del agua porcina en el suelo.
- Enriquecimiento de nutrientes y crecimiento explosivo de colonias de microorganismos que afectan la calidad de agua (eutrofización).
- Salinización del agua y suelo.
- Contaminación por metales pesados, (Cu y Zn

1.7- Tratamiento de aguas residuales porcinas

La problemática de las aguas residuales porcinas ha sido abordada mediante diferentes tipos de tratamientos de aguas. Cabe mencionar que actualmente no existe una solución ideal aplicable a todos los casos, por lo que la efectividad de un proceso de tratamiento de aguas residuales se basa en la integración de dos principales tipos de tratamientos:

Tratamientos físico-químicos: Consiste la separación de las diferentes fases de las aguas residuales porcinas, principalmente por tamizado y sedimentación. Su finalidad es reducir la cantidad de sólidos, separar las fases sólida y líquida del agua residual, lo que permite mayor eficiencia en el tratamiento de aguas residuales.

Tratamientos biológicos: Comprenden una serie de procesos biológicos en donde la finalidad es transformar o modificar algunas moléculas orgánicas en virtud de la presencia de microorganismos anaerobios tales como bacterias, las cuales pueden remover hasta un 90 % de materia orgánica, y que además permiten la obtención de otros recursos aprovechables como el biogás y estiércol (Escalante, 2011). Otro tipo de tratamiento biológico de aguas residuales porcinas son las lagunas de estabilización, en donde el proceso de transformación de la materia orgánica se da a través de procesos aerobios y anaerobios en diferentes estratos del contenedor; los procesos anaerobios

ocurren en el fondo del contenedor, mientras que en las capas adyacentes se realizan procesos aerobios, como producción de oxígeno por organismos fotosintéticos.

1.8- El uso de plantas acuáticas como tratamiento de aguas residuales porcinas: Humedales artificiales

Un ejemplo del uso de plantas acuáticas en el tratamiento de aguas residuales porcinas son los humedales artificiales, en donde se llevan a cabo procesos físicos, químicos y biológicos mediante la interacción entre el agua, el medio filtrante, las plantas, los microorganismos y la atmósfera (Arias- Martínez *et al.*, 2010). Estos humedales consisten en tinajas o construcciones donde se incluyen plantas acuáticas y microorganismos asociados a ellas, que son capaces de modificar propiedades fisicoquímicas de las aguas residuales como el pH, el contenido total de sólidos suspendidos, la demanda bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno, oxígeno disuelto, contenido de nutrientes y minerales, entre ellos metales pesados.

El principio básico de como un humedal artificial funciona es a través de la interacción de las plantas, sedimentos y microorganismos sobre los diversos parámetros fisicoquímicos y sustancias presentes en el agua residual (Cuadro 1.6). El uso de vegetación acuática favorecen el tratamiento de agua residual en varias formas: dado a que muchas especies acuáticas y semiacuáticas poseen tejidos aerenquimatoso, estas actúan como canales de transporte de gases (como metano y bióxido de carbono) hacia la atmósfera, y a su vez facilitan la entrada de oxígeno atmosférico hacia el medio. Por otro lado, algunas investigaciones han propuesto que los humedales construidos pueden ser una alternativa viable para remover la alta concentración de nutrientes y metales pesados en las aguas residuales a través del crecimiento de la biomasa de microorganismos y la toma directa de las plantas (Reddy y D'Angelo, 1997). Por otro lado, en especies con raíces densas, estas contribuyen a formar una superficie de crecimiento para colonias de microorganismos, los cuales también son útiles en la degradación, transformación y acumulación de metales pesados y nutrientes (Mena, *et al.*, 2008)

Cuadro 1.6. Mecanismos de depuración predominantes en humedales artificiales (Modificado de Cortés- Esquivel, 2012).

Contaminantes	Mecanismos de eliminación
Sólidos suspendidos	Sedimentación y filtración.
Materia orgánica	Degradación microbiana aerobia y anaerobia.
Nitrógeno	Amonificación seguido por nitrificación microbiana y desnitrificación. Asimilación por parte de las plantas y volatilización del amoníaco.
Fósforo	Adsorción por parte del lecho. Asimilación por parte de las plantas.
Metales pesados	Asimilación por parte de las plantas. Intercambio iónico por parte de las raíces.

1.9- Fitorremediación de metales pesados empleando plantas acuáticas

Se conoce como fitorremediación al conjunto de tecnologías que utilizan organismos vegetales para reducir la concentración de contaminantes presentes en el medio a partir de procesos bioquímicos realizado por las células de las plantas y los microorganismos asociados a ellas. En general, la fitorremediación es aplicable tanto a contaminantes orgánicos e inorgánicos, los cuales difieren en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, y a los mecanismos por los que las plantas los metabolizan. En cualquier caso, se considera que las raíces de las plantas son el órgano por excelencia por el cual los contaminantes pueden ingresar a los tejidos de las plantas y ser transportados a diferentes órganos de los vegetales, y en el caso de la fitorremediación con metales pesados, los principales mecanismos involucrados son: (Dhir, 2013):

Rizofiltración: se basa en la remoción de metales en el agua y/o suelo a través de las raíces de las plantas. Este proceso involucra la adsorción del metal y precipitación en las raíces, seguido de la absorción, secuestro, transporte y acumulación en las vacuolas celulares y/o otros organelos. En este proceso, la mayor concentración de metales se encuentra en las raíces, mientras que la translocación hacia la parte aérea ocurre en menor forma.

CAPITULO I- ANTECEDENTES

Fitoextracción: En este proceso, la adsorción, absorción y acumulación de los metales ocurre similar a la rizofiltración, salvo a que en este proceso, la translocación de los contaminantes hacia los órganos aéreos de las plantas ocurre en mayor medida que en la rizofiltración. Este mecanismo es aplicable para algunos elementos metálicos, y para compuestos orgánicos en sedimentos, suelos y lodos.

Las plantas acuáticas y semiacuáticas poseen un enorme potencial para ser aplicables en la fitorremediación, dado a su capacidad para remover y absorber contaminantes orgánicos e inorgánicos, y muchas de ellas han recibido el nombramiento de “especies hiperacumuladoras” (Dhir, 2013). De acuerdo con Reeves y Baker, (2000), este criterio se emplea en especies que pueden alcanzar una concentración de metal equivalente o mayor al 0.01% del peso seco total de la planta (en el caso del Zn, la concentración mínima es de 0.1% del peso seco total de la planta). En el Cuadro 1.7 se resumen algunas de las principales especies que han sido estudiadas en cuanto a su capacidad para remover metales de soluciones acuosas, las cuales han sido propuestas como hiperacumuladoras de metales pesados:

Cuadro 1.7. Principales plantas acuáticas empleadas en la fitorremediación y las concentraciones máximas alcanzadas (Tomado de Dhir, 2013).

Especie	Elemento y concentración máxima
<i>Azolla filiculoides</i>	Pb=2.28 Cd=2.6-9.0, Cu=6.2, Zn=1.2, Ni= 1.0 mg/g PS.
<i>Pistia stratiotes</i>	Hg=0.156, Cr= 1.6 Cu= 1.0 mg/g PS
<i>Eichhornia crassipes</i>	Cr= 4.0, Cu= 6.0, As= 90.58 , Cd=2.2, Ni= 1.200, Zn=10.0, Hg= 1.0 mg/g PS
<i>Lemna gibba</i>	As= 1.1, Cd= 14.0, Ni= 1.4 mg/g PS
<i>Typha latifolia</i>	As= 1.120, Zn= 1.2, Cu= 1.15, Ni= 2.96 mg/g PS
<i>Ceratophyllum demersum</i>	Ni= 4.89 a 7.74 mg/g PS

1.10- Salvinia como planta hiperacumuladora de metales pesados

Salvinia minima Baker es un helecho acuático flotante perteneciente a la familia Salvinaceae. Se distribuye en América del Norte y Centro. En México, se distribuye en Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Chiapas, Veracruz, Tabasco y Tamaulipas (CICY, 2016). Esta especie habita generalmente en cuerpos de agua dulce con poco movimiento de agua. Entre las características más relevantes de esta especie, se encuentran sus frondas flotantes, de 0.4 a 2 cm de longitud, de forma redondeada y cubiertas con tricomas de 2 a 3 mm de color blanco. Esta especie posee unas raíces falsas, las cuales histológicamente son frondas modificadas con función de raíces (Fig. 1.1). Prefiere zonas ricas en nutrientes y una temperatura tropical dentro de un rango de 22° C a 43°C, y un pH ligeramente ácido a ligeramente alcalino (AIS, 2005). Se reproduce de manera asexual y sexual; en la forma asexual, los nudos se pueden dividir para formar nuevos brotes laterales, que están provistos de un par de hojas y una raíz. En cuanto a la reproducción sexual, esta especie posee esporangios en donde se encuentran tanto esporofitos y gametofitos multicelulares e independientes, con esporas como unidad de dispersión en forma de espiral a lo largo del eje principal de los filamentos sumergidos (Fuentes, 2014).

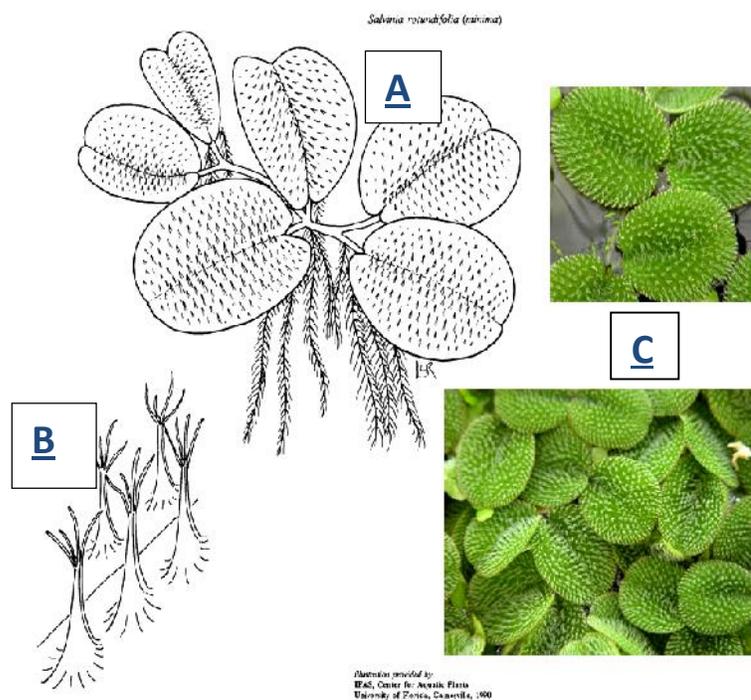


Fig 1.1: Morfología de *S. minima* Baker. A) Planta completa; B) Tricomas en la epidermis de las hojas; C) Hojas con tricomas. (Tomado de Fuentes, 2014).

CAPITULO I- ANTECEDENTES

El género *Salvinia* comprende unas 12 especies descritas, la cuales han sido reconocidas como un género de plantas hiperacumuladoras de metales pesados. En el Cuadro 1.8 se presentan estudios de plantas del género *Salvinia* en la acumulación de metales pesados y sus concentraciones máximas alcanzadas en los tejidos (Cuadro 1.8).

Cuadro 1.8 Ejemplos de especies del género *Salvinia* y su utilidad en la toma de metales pesados.

Especie	Elemento y concentración	Referencia
<i>Salvinia cucullata</i>	Cd= 1631mg/ kg Pb=14305 mg/kg peso seco	Phetsombat <i>et al.</i> , (2006)
<i>Salvinia natans</i>	Cr= 10.6 Zn= 4.8 As= 200 mg/kg peso seco	Dhir <i>et al.</i> , (2008)
<i>Salvinia minima</i>	Ni= 16.8 mg/g Pb= 2 ng/g Cd=1 ng/g Cu= 8 mg/g Zn= 10 ng/g peso seco	Dhir, <i>et al.</i> , 2013; Hoffman, <i>et al.</i> , 2004; Fuentes, <i>et al.</i> , 2014
<i>Salvinia molesta</i>	Cu= 6 mg/g peso seco	Azevedo y Peixoto-Henares ,2015

Existen características que hacen de *Salvinia* un género con enorme potencial para su uso en la fitorremediación:

- Dado a que son plantas con un rango de distribución bastante amplio, poseen un rango de tolerancia térmica, que va de -3 a 43° C (Whiteman y Room, 1991).
- Son plantas con una rápida tasa de crecimiento, puesto que en condiciones nutricionales controladas, puede alcanzar una productividad de 32 ton/ha /año (Agami y Reed, 1989) y si las condiciones ambientales y la calidad del agua es propicia, puede duplicar su biomasa en 3.5 días (Dhir, 2013).
- Es capaz de sobrevivir y proliferar en medios con altas cargas orgánicas, ya que puede tolerar hasta 140 mg/L de amonio en el agua (Olguín, 2007).
- En comparación con otras especies de menor tamaño (*Lemna gibba*, *Spirodela polyrriza*, *Wolffia sp.*) *Salvinia* es una planta fácil de cosechar una vez que el tratamiento ha concluido.

1.11- Funciones del Cu y Zn en plantas

Cobre: Es un metal de transición con alto potencial redox, dado a que posee dos estados de oxidación bajo condiciones fisiológicas (Cu^{+1} y Cu^{+2}). Está involucrado en múltiples procesos celulares: cadena de transporte de electrones, respiración celular, en mecanismos de respuesta de estrés oxidativo, metabolismo de la pared celular, señalización de hormonas, lignificación, formación de polen y fertilización y metabolismo del carbono y del nitrógeno (Broadley *et al.*, 2009)

Se estiman alrededor de 100 proteínas vegetales que contienen cobre, y más del 50% de este elemento se encuentra en los cloroplastos, principalmente unido a la plastocianina. En el Cuadro 1.9 se presenta sólo algunas enzimas que contienen cobre, así como la función que desempeñan en plantas:

Cuadro 1.9 Algunas enzimas que contienen cobre, y su función (Broadley *et al.*, 2009)

Proteína (Enzima)	Función
Plastocianina	Transporte de electrones del complejo PSII a PSI.
Superoxido dismutasa	Defensa contra el estrés oxidativo. Antioxidante
Citocromo c Oxidasa	Transferencia de electrones y generación de gradiente electroquímico para la ATP sintasa
Ascorbato oxidasa	Oxidación del ácido ascórbico. Reducción de O_2 en agua
Diamino oxidasa	Desaminación oxidativa y formación de grupos aldehídos implicados en la apoptosis, proliferación y diferenciación celular
Polifenol oxidasa	Oxidación de compuestos fenólicos para precursores de lignina.

Deficiencia de Cu: Los síntomas por deficiencia de Cu en plantas son la inhibición en el crecimiento, distorsión de hojas nuevas, clorosis y necrosis en los bordes de las hojas, y blanqueamiento de hojas nuevas (Broadley *et al.*, 2009). En cuanto a la fisiología de las plantas, la deficiencia de cobre en plantas está ligada a un descenso de la actividad

CAPITULO I- ANTECEDENTES

del transporte de electrones en PSI, debido a que hay una disminución en la formación de plastocianina (Yruela, 2009), un bajo contenido de clorofila y carotenoides (Baron, *et al.*, 1995) y desintegración de la membrana tilacoides en los cloroplastos (Baszynski, 1978).

Toxicidad por Cu: Dentro de los efectos tóxicos del cobre en plantas se encuentran: Inhibición y disminución del crecimiento, clorosis, disminución de los pigmentos fotosintéticos, degradación de los tilacoides y disminución de la actividad fotoquímica, cambios en la membrana por peroxidaciones lipídica y estrés oxidativo (Yruela, 2009).

Zinc: Es el segundo elemento metálico más abundante después de Fe y de todos los metales de transición con función biológica conocida, es el único que posee un solo estado de oxidación (Zn^{+2}), por lo que no participa en reacciones de óxido-reducción. Es un elemento predominante en la transcripción y traducción, debido a que en plantas, se ha estimado que cerca del 12 al 50% de Zn celular está asociado a estos procesos (Krämer y Clemens, 2005). En plantas, el Zn forma parte de la estructura de péptidos, así como participar en la síntesis de triptófano y ácido indol-acético, metabolismo de carbohidratos, síntesis de proteínas, entre otros (Broadley *et al.*, 2009) En el Cuadro 1.10 se resumen algunas de las principales enzimas que requieren Zn, así como su función:

Cuadro 1.10 Algunas enzimas que contienen Zn y su función (Krämer y Clemens, 2005).

Proteína (Enzima)	Función
ADN Polimerasa y ARN Polimerasa	Replicación del ADN y síntesis de ribonucleótidos para la transcripción del ADN
Histona desacetilasa	Eliminación de grupos acetilo de histonas, que previene la unión al ADN
Factores de corte y empalme (Splicing factors)	Remoción de intrones del ARN mensajero.
Citidina deaminasa	Conversión de Citidina en Uracilo
-Manosidasa	Degradación por hidrólisis de la glicoproteínas.
Superoxido dismutasa	Conversión de ROS a H_2O_2 y O_2

Deficiencia de Zn: La deficiencia de zinc en plantas provoca un crecimiento lento y enanismo por una reducción en la actividad enzimática de la anhidrasa carbónica, lo que limita la asimilación de CO₂ en plantas C₄. Se ha observado otros signos del déficit de Zn, los cuales se caracterizan por plantas con hojas cloróticas, malformaciones y con una senescencia temprana. Otro efecto de la deficiencia de Zn es la reducción de actividad antioxidante de las plantas (Kirkby *et al.*, 2007) lo cual implica cambios en permeabilidad de las membranas a medida que los radicales libres de O₂ rompen enlaces dobles de ácidos grasos y fosfolípidos de las membranas celulares

Toxicidad por Zn: Entre los efectos tóxicos del zinc se encuentran: inhibición de la elongación de raíces, clorosis en hojas de reciente formación, inhibición de la fotosíntesis por inhibición de la enzima RuBP- carboxilasa, reducción en la conductancia estomática y conductancia del mesófilo e inhibición de la actividad del fotosistema II por cambios en la membrana de los tilacoides (Broadley *et al.*, 2009).

Dado a que las plantas son organismos sésiles, han evolucionado y desarrollado mecanismos para hacer frente a los cambios de concentraciones de elementos metálicos en la corteza terrestre y en el agua. Es por ello que, se postula que las plantas desarrollaron sistemas de destoxificación de metales antes, y que la evolución en su uso en las reacciones bioquímicas se originó después (Krämer y Clemens, 2005). La homeostasis de elementos metálicos en plantas es entonces, resultado de la regulación en la adquisición, transporte, y acumulación de elementos metálicos en el interior de las células. Dado a que estos elementos son necesarios para reacciones de óxido – reducción y para mantener enlaces estables entre ligandos orgánicos, las plantas deben controlar la concentración de estos elementos hacia niveles fisiológicamente adecuados y al mismo tiempo, evitar desajustes en la acumulación y metabolismo de metales, ya que elevadas concentraciones intracelulares supone graves riesgos a nivel metabólico, debido a la alta afinidad de los metales por establecer enlaces químicos con moléculas orgánicas de manera descontrolada.

El transporte de metales está regulado por extensas familias de transportadores de origen proteico, que varían en especificidad, patrones de expresión y en su localización celular, y que a su vez se encuentran gobernados por mecanismos genéticos. En general, estos transportadores están acoplados a la membrana plasmática de las células

CAPITULO I- ANTECEDENTES

vegetales. Brevemente, se enlistan algunas de familias encargadas del transporte de Cu y Zn a interior de las células:

Proteínas de transporte de metales (HMA-ATP-ase o Heavy Metals- ATP-asas): La superfamilia de ATP-asas de tipo P utilizan energía de la hidrólisis del ATP para trasladar cationes a través de membranas biológicas. Las ATP-asas de tipo P_{1B} están involucradas en el transporte de metales pesados, y estas poseen 8 dominios transmembranales, con un motivo CPx que está involucrado en la traslocación y unión de metales a regiones amino o carboxilo. En *Arabidopsis thaliana*, estos están involucrados en el transporte de metales pesados (de HM1 a HM8), siendo los primeros cuatro responsables del transporte de Zn, Cd, Pb y Co. En el caso del transporte de Cu, se conocen dos proteínas de esta familia: HM5 y HM7. (Colangelo, 2006).

Familia de transportadores CDF (Cation Diffusion Facilitator): Esta familia de proteínas poseen 6 dominios transmembranales y codifican para el transporte de metales fuera del citoplasma. En plantas de *A. thaliana* se conocen doce miembros de esta familia, siendo MTP1 el único caracterizado. Esta proteína posee un papel importante en el transporte de Zn, dado que la sobreexpresión de éste confiere una tolerancia a niveles tóxicos de Zn (Grotz, 2006).

COPT (Copper Transporter): Los miembros de esta familia poseen tres dominios transmembranales, y algunos de ellos poseen poros por los cuales el Cu puede moverse hacia el interior de la célula. Estos se nombran de COPT1 a COPT5, y se han dividido en tres grupos: 1) COPT1 y COPT2, que poseen una mayor afinidad para transportar Cu. 2) COPT 3 y COPT 5 que poseen un nivel intermedio para el transporte de Cu, y 3) COPT4, con un importante papel en el transporte de Cu a través de las raíces, dado a que en este tejido se ha encontrado un mayor nivel de expresión (Yruela, 2009).

Chaperonas de cobre (Metalochaperonas): Son un grupo de moléculas de bajo peso molecular, de origen proteico, que se encuentran en el citoplasma. Su principal función es recibir iones de Cu y participar en el transporte intracelular de este elemento hacia sitios activos de enzimas dependientes de Cu. En *A. thaliana* se han identificado tres grupos: CCH, COX17 y CCS (Yruela, 2009).

ZIP: Poseen ocho dominios transmembranales, con sitios ricos en histidina. Existen más de 100 proteínas que se incluyen en esta familia de transportadores, y se han

CAPITULO I- ANTECEDENTES

identificado en gran variedad de células eucariotas. En *Arabidopsis thaliana*, se han encontrado 16 de estos miembros. ZIP1 a ZIP4 son proteínas que permiten la entrada de Zn hacia las células, siendo ZIP1 y ZIP3 específicas de las raíces y ZIP4 encargadas del transporte de Zn en hojas y tallos (Guerinot, 2000).

JUSTIFICACION

La actividad porcícola en México es una de las más importantes tanto en términos productivos como sociales (Valero, 2002). Se estima que genera 49 mil empleos directos y 245 mil indirectos (Cortés-Esquivel, 2012) y de acuerdo con el Censo Agrícola, Ganadero y Forestal de 2007, en México se contabilizaron más de 979 mil unidades de producción de ganado porcino, y probablemente la cifra sea superior ya que no han sido totalmente contabilizadas algunas unidades de producción familiar o comunal que abasten la demanda local. Los estados en donde se concentra una mayor actividad son: Jalisco, Sonora, Veracruz, Guanajuato y Yucatán, siendo este último el tercer lugar nacional en producción (Papillon, 2012).

Los metales pesados son conocidos por ser altamente tóxicos en pequeñas dosis y a diferencia de los contaminantes orgánicos, no pueden ser degradados. Éstos se acumulan en el agua, suelos, sedimentos y en los organismos vivos, y presentan tanto biomagnificación como bioacumulación (Miretzky, 2004). Se reconoce que éstos representan un riesgo no solo para la salud humana sino para la biota en general (Sapci, 2012), por lo que se requieren métodos para su eliminación en los medios naturales, y a pesar de la existencia de éstos (intercambio iónico, ósmosis inversa, electrólisis, precipitación y adsorción) en general provocan grandes impactos ambientales y tienden a ser muy costosos, especialmente si es necesario tratar grandes volúmenes de agua o se requieren altos estándares de limpieza (Miretzky, 2004). Resulta necesario explorar nuevas alternativas que sean resulten económicas y ambientalmente pertinentes, y que a su vez que puedan ser integradas en conjunto con las tecnologías existentes para lograr una mayor eficiencia y que apoyen al desarrollo sustentable, y sobre todo, contribuir en la generación de información de especies acuáticas de distribución regional que puedan ser aplicables en futuros esfuerzos de tratamientos de agua residual y en particular, con aguas residuales porcinas.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la capacidad de acumulación de cobre y zinc en tejidos de *S. minima* bajo dos escenarios: utilizando concentraciones experimentales de estos metales y bajo la exposición de diluciones de agua residual porcina en un ambiente semicontrolado?
¿Cuáles son efectos fisiológicos, morfológicos y de crecimiento de *S. minima* tras la exposición a los tratamientos experimentales?

¿Existirá alguna relación entre el tiempo de exposición y la concentración final del elemento en la planta y el grado de estrés producido?

HIPÓTESIS

- 1) Las plantas de *S. minima* serán capaces de absorber cobre y zinc presentes en el medio experimental, y la toma de estos elementos será dependiente de la concentración del metal en el medio. Así mismo, se espera que un mayor tiempo de exposición de las plantas resulte en una mayor concentración en los tejidos.
- 2) La fisiología de las plantas se verá afectada negativamente en relación a la acumulación de cobre y de zinc en sus tejidos. En este sentido, la eficiencia fotosintética máxima disminuirá y el daño sobre las membranas celulares será mayor en aquellas plantas que acumulen mayor contenido de metales, lo que provocaría un descenso en la tasa de crecimiento relativa y retrasos en el desarrollo de nuevas hojas en esta especie.

OBJETIVO GENERAL

- Estimar la eficacia de acumulación de Cu y Zn de *Salvinia minima* Baker expuestas a dos condiciones: utilizando un gradiente de concentraciones experimentales de CuSO_4 y ZnSO_4 y ante la exposición a cuatro diluciones de agua residual porcina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Medir las propiedades fisicoquímicas (pH, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, amonio, nitratos y contenido de Cu y Zn) del agua residual porcina producida por la Unidad Porcina, ubicada en el CCBA- UADY.
- Evaluar la capacidad de acumulación de Cu y Zn en las hojas y raíces de *S. minima* tanto para plantas expuestas a dosis experimentales de CuSO_4 y ZnSO_4 así como para plantas expuestas a diluciones de aguas residuales porcinas (10% al 25% de su concentración original).
- Evaluar los cambios en algunas variables fisiológicas (fluorescencia de clorofila y fuga de electrolitos) en plantas de *S. minima* expuestas a diferentes concentraciones experimentales de CuSO_4 y ZnSO_4 y en plantas expuestas a los tratamientos con diluciones de agua residual porcina.
- Describir los cambios en la morfología, (aspecto de hojas) y de crecimiento de las plantas (peso seco, longitud de raíces, no. de hojas, tasa de crecimiento relativa y mortalidad de las hojas) en plantas expuestas bajo diferentes concentraciones experimentales de CuSO_4 y ZnSO_4 y en plantas expuestas a los tratamientos con diluciones de aguas residuales porcinas.

CAPITULO II- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- Acumulación de Cu y Zn de *S. minima* ante la exposición a diferentes concentraciones CuSO_4 y ZnSO_4 : efectos fisiológicos y de crecimiento.

2.1.1- Recolecta de *Salvinia minima* Baker ecotipo Yucatán.

Las plantas de *Salvinia minima* Baker fueron recolectadas en el Jardín Botánico del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Fueron seleccionadas aquellas plantas que posean un aspecto saludable y sin signos visibles de envejecimiento, como cambio de coloración debido a marchitez o edad avanzada. Una vez recolectadas, las plantas fueron enjuagadas con agua corriente de manera que se eliminen impurezas, materia orgánica, microorganismos y otros residuos que pudieran interferir con el experimento. Posteriormente, fueron colocadas en una tina plástica con una capacidad de 10 L en agua destilada durante un periodo de 3 d, con el fin de depurar el material orgánico y microorganismos presentes en las plantas. Se cambió diariamente el agua destilada al final del día utilizando un volumen constante de agua. Debido a que algunas plantas poseían microalgas creciendo en las raíces, fue necesario realizar un enjuague adicional bajo la llave de agua potable durante 30 s. Este procedimiento se realizó una vez al día, durante 4 d consecutivos.



Fig .2.1 Plantas de *S. minima* aclimatadas, que fueron utilizadas para la experimentación.

2.1.2- Aclimatación de las plantas al sitio del experimento

Las plantas fueron aclimatadas por 5 días en un vivero experimental ubicado en el CICY. Las condiciones ambientales del vivero se resumen en el Cuadro II-1. Para la aclimatación, las plantas de *S. minima* fueron crecidas por 5 días en una solución nutritiva de Hoagland (modificada de Hoffmann, 2004)

Cuadro 2.1 Condiciones ambientales el Vivero no. 5, que fue donde crecieron las plantas y donde se realizó la exposición a los tratamientos

Humedad relativa (%)	62% Diurna - 70 % Nocturna
Temperatura (°C)	32° C Diurna- 26°C Nocturna
Déficit de presión de vapor (kPa)	2.61 Diurno - 1.20 Nocturno
Luz diaria promedio (mol/m ² día)	43.14

2.1.3- Diseño de exposición de plantas a los tratamientos con Cu y Zn

La exposición de las plantas a cobre y zinc se realizó por separado. Para ello, se emplearon 36 recipientes, y por cada recipiente se colocaron 10 pares de hojas de *S. minima* previamente lavada y aclimatada. En ambos casos, las concentraciones evaluadas fueron 0.0, 20, 40 y 80 μM de CuSO_4 y ZnSO_4 , las cuales fueron preparadas con agua destilada a partir de una concentración madre de 1 M de estos compuestos. En cada recipiente se coloraron 200 mL de cada tratamiento experimental. Para ambos experimentos, el tiempo de exposición fue de 1, 2 y 4 días en los cuales se determinaron los parámetros fisiológicos y de crecimiento.

Tratamiento Tiempo exposición	0 μ M	20 μ M	40 μ M	80 μ M
Día 1				
Día 2				
Día 4				

Fig 2.2 Descripción del diseño experimental empleado para los ensayos de *S. minima* en CuSO_4 y en ZnSO_4 . Cada miniatura representa una réplica en cada recipiente, provisto con 10 pares de hojas c/u, y 200 mL de solución experimental. El tiempo de la exposición fue de 1, 2 y 4 días.

2.1.4- Determinación de metales pesados en hojas y raíces de *S.minima*

2.1.4A.- Preparación de las muestras

Una vez secadas las muestras, se utilizó el método de digestión ácida (Hoffmann, *et al.*, 2004), con algunas modificaciones: para la preparación de las muestras de las hojas de plantas expuestas, se colocaron 20 mg del tejido seco en tubos Eppendorf de 2 mL, y después se adicionaron 200 μ L de HNO_3 al 70% (Sigma-Aldrich). Para las muestras de raíces de plantas expuestas, se colocaron 10 mg de peso seco en tubos Eppendorf de 2 mL y se agregaron 100 μ L de HNO_3 . Ambas preparaciones fueron calentadas en un baño maría a 80°C durante 3 horas. Posteriormente, la biomasa digerida fue aforada a 2 mL con agua desionizada, y se agitaron en un vórtex (Thermolyne) durante 5 minutos. Todas las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm en una centrifuga durante 15 minutos. El sobrenadante de cada muestra se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad nuevos y fueron almacenados en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su análisis. Finalmente, todas las muestras fueron aforadas a un volumen de referencia de 5 mL. Utilizando para ello recipientes desechables de poliestireno.

2.4.1B - Cuantificación de Cu y Zn en muestras digeridas

La cuantificación de la concentración de Cu y Zn se realizó en un espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 200 (Perkin- Elmer, USA). De acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante para la determinación de Cu y Zn, la calibración del equipo consistió en 4 estándares con las siguientes concentraciones: 0.1, 0.5, 1, 4 y 5 ppm de Cu (a partir de una solución madre de 100 ppm de Cu) y de 0.1, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 ppm para el caso de Zn (a partir de una solución madre de 5 ppm de Zn), utilizando como blanco HNO₃ al 1% y obteniendo una curva patrón en ambos casos con un coeficiente de determinación de R²= 0.99.

Con el objetivo de que las muestras estuvieran dentro de la curva de calibración, fue necesario diluirlas con agua destilada, con los siguientes factores de dilución (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Factores de dilución empleados en la cuantificación de Cu y Zn en muestras digeridas mediante método de digestión ácida. El factor de dilución se obtiene de la división del volumen final de la preparación (en mL) entre el volumen de alícuota utilizado (Volumen inicial, en mL),e indica cuantas veces se encuentra diluida una muestra.

Tipo de muestra	Tejido	Factor de dilución
20 a 80 µM de CuSO ₄	Hoja	5/2= 2.5
	Raíz	5/1= 5
20 a 80 µM de ZnSO ₄	Hoja	5/0.10= 50
	Raíz	5/0.10= 50

Las muestras fueron leídas a 213.856 y 324.754 nm para zinc y cobre, respectivamente. Las determinaciones se realizaron por triplicado (n=3) para cada tratamiento y tiempo de exposición. La concentración del metal se expresa en mg de metal por gramo de peso seco (mg metal/ g PS) mediante la siguiente conversión (Rüdel, 2007):

$$E = V/M \times E$$

Donde:

E= Proporción de la masa del elemento en unidad de biomasa (mg metal/ g PS)

M= Masa de la muestra utilizada (mg); **V**= Volumen de referencia (mL) **E**= Concentración de la muestra obtenida en el equipo, corregida por el factor de dilución (mg/L)

2.1.5- Factor de Bioconcentración (FBC) y Factor de Translocación (FT)

Para determinar la toma de metales del medio por parte de los tejidos de *S. minima*, se calculó el factor de bioconcentración (FBC), que se define como el cociente de la concentración del metal en el material vegetal (mg/kg peso seco) por la concentración inicial del metal en la solución (mg/L) (Satpahty *et al.*, 2014). Se determinó el factor de translocación (FT) que es el cociente de la división de la concentración del metal en los órganos aéreos y raíz (Barman *et al.*, 2000).

FBC= Concentración de metal en los tejidos (mg/kg) / Concentración de metal en el medio (mg/L)

FT= Concentración de metal en los órganos aéreos (mg/kg) / concentración del metal en la raíz (mg/kg)

2.1.6- Evidencia fotográfica de la exposición de las plantas de *S. minima* a Cu y Zn y al agua residual porcina

Se tomaron fotografías de las hojas de las plantas una vez transcurrido el tiempo de exposición a Cu y Zn, para cada caso (0, 1, 2 y 4 días) empleando una cámara fotográfica marca Sony modelo T-300 de 10.1 megapíxeles de resolución.

2.1.7- Número de hojas, longitud de las raíces y mortalidad de las plantas

Se contaron el número de hojas al término de la exposición de las plantas a los tratamientos experimentales propuestos. Así mismo, se midió la longitud de las raíces (n=3) de 6 plantas por cada tratamiento experimental al término del tiempo de exposición. La mortalidad de las plantas fue medida al último día de exposición de cada tratamiento y para ello se contabilizaron el número de hojas que presentaron coloración negra o marrón en más del 50% de la superficie de la hoja y se dividió esa cantidad entre el número total de hojas, multiplicado por 100 para su expresión en porcentaje, la cual fue calculada por triplicado.

2.1.8- Biomasa y tasa de crecimiento relativa

Para la determinación del peso seco, las muestras fueron secadas en un horno a 80° C hasta que el peso de las muestras entre un día y otro no presentara variaciones, lo cual sucedió entre el tercer y cuarto día de secado. El peso seco inicial (Tiempo 0) fue obtenido a partir de 10 lotes de 10 pares de hojas cada uno, tomadas del lote en donde se aclimataron las plantas un día antes de comenzar con los experimentos. Las muestras fueron pesadas en una balanza analítica y se calculó el promedio de tres réplicas y el error estándar para cada día de exposición y tratamiento.

La tasa de crecimiento relativa (RGR) consiste en el incremento de biomasa por unidad de biomasa y tiempo. Esta variable fue calculada para cada uno de los tratamientos, empleando la siguiente formula:

$$RGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$$

Siendo:

W_2 = biomasa total en peso seco (hojas + raíces) al día 4.

W_1 = biomasa total al tiempo 0.

t_2 = tiempo final (día 4)

t_1 = tiempo inicial (día 0)

2.1.9- Fluorescencia de la clorofila en *S. minima* (Fv/Fm)

Cuando la luz es captada por las plantas, parte de esta energía es utilizada para hacer un trabajo químico (energía fotoquímica) mientras que el excedente es disipado en forma de calor o en emisión de fluorescencia. Estos procesos ocurren simultáneamente, por lo que el incremento en la eficiencia de uno de ellos, resultará en la disminución de los otros dos (González- Moreno, *et al.*, 2008). Los metales pesados, al igual que otros agentes estresores (temperaturas extremas, salinidad, sequía) afectan el funcionamiento de los fotosistemas (por destrucción de complejos enzimáticos y transportadores de electrones) y con ello provocan cambios en la eficiencia cuántica máxima, por lo que el estudio de la fluorescencia de clorofila en plantas vivas resulta una herramienta no invasiva sobre el estado fotosintético de la planta.

La eficiencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m) es calculada mediante la fluorescencia inicial (F_o ; en ausencia de luz y los centros de reacción abiertos), la fluorescencia máxima (F_m ; después de un pulso de luz saturante, y los centro de reacción cerrados), y la fluorescencia variable (la diferencia entre la fluorescencia máxima y la fluorescencia inicial) y refleja la probabilidad con la que la energía absorbida de un fotón será usada para la fotosíntesis si todos los centros de reacción estuvieran abiertos (en plantas, los valores “saludables” se encuentran entre 0.85 y 0.65).

Para esta técnica, se utilizó un fluorómetro marca Hansatech modelo Multi PEA (Reino Unido). Para ello, se emplearon 5 hojas por cada recipiente de cada tratamiento. Antes de la medición, las hojas de *S. minima* fueron adaptadas a la oscuridad por 20 minutos. Cada muestra de hoja se expuso a un pulso de luz saturante ($3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durante 1 segundo para obtener la eficiencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m).

2.1.10-Cuantificación de fuga de electrolitos en *S. minima*

La cantidad de electrolitos perdidos después de que una planta ha sido expuesta a un determinado agente estresor (metales pesados, salinidad, o temperaturas extremas, por ejemplo) es una forma práctica y rápida de conocer la integridad de las membranas celulares. Esta técnica mide los cambios de conductividad eléctrica en las muestras, y está basada en la idea de que cuando una célula o tejido se encuentra bajo un marcado estrés, uno de los primeros síntomas es la disrupción de la permeabilidad de sus membranas y la pérdida de la capacidad para retener solutos (iones y otros compuestos), lo que provoca un aumento de la conductividad eléctrica de una muestra (conductividad inicial).

Después, se provoca la lisis de todas las células para liberar el total de electrolitos de la muestra mediante el calentamiento (conductividad final) y la división de estas dos cantidades y su expresión en términos porcentuales representa la fuga de electrolitos del tejido, el cual se espera que fuese más alto en plantas que recibieron el agente estresante en relación a plantas que no recibieron el tratamiento.

Para realizar esta técnica, se seleccionaron 3 hojas y 3 raíces de 3 plantas de cada recipiente para cada uno de los tratamientos ($n=9$). En cada una de las hojas se realizó un corte longitudinal evitando desprender ambas porciones. En cuanto a las raíces, no se realizaron cortes. Las muestras seccionadas fueron colocadas en frascos de

CAPITULO II-MATERIALES Y METODOS

centelleo con capacidad de 45 mL con tapa y fueron suspendidas en 20 mL de agua destilada y se agitaron a 100 rpm por 2 horas a temperatura ambiente con un agitador orbital (LabLine Dual Action Shaker) para obtener la conductividad inicial (CEi) de las muestras, utilizando para ello un conductímetro Orion, modelo 162 (USA).

Posteriormente las muestras fueron calentadas a 120°C por 15 minutos en una autoclave marca Felisa (México) y 24 horas más tarde, se midió la conductividad eléctrica final (CEf) Para la obtención de la fuga de electrolitos, se utilizó la siguiente fórmula: (Fuentes, 2014):

$$\% \text{ de fuga de electrolitos} = (CEi/CEf) \times 100$$

CEi = conductividad eléctrica inicial.

CEf= conductividad eléctrica final.

2.2. Efectos fisiológicos, de crecimiento y acumulación de Cu y Zn de S. minima ante la exposición a diferentes concentraciones de agua residual porcina”

2.2.1- Caracterización del agua residual porcina

El sitio de estudio fue la Unidad Porcícola del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán ubicado en el Km 15.5 de la Carretera Mérida-Xmatkuil. Esta granja opera desde hace 45 años y a la fecha de elaboración de la tesis, contaba con aproximadamente 500 cerdos de diferentes edades, de acuerdo con el M. en C. Pedro Chimal Chan, quien es el responsable de esta Unidad de Producción.

La caracterización del agua residual porcícola se realizó por 7 días, con el objetivo de conocer si existe variabilidad en la calidad del agua generada en los días de la semana. Este muestreo se realizó del 03 de febrero del 2016 al 11 de febrero de 2016 y se determinó el pH, oxígeno disuelto, temperatura, y conductividad eléctrica, así como el contenido de nitratos, amonio, Cu y Zn. Para ello, se tomó una muestra diaria proveniente del cárcamo recolector del agua residual porcina (Fig. II-1). La muestra fue envasada en una botella de tereftalato de polietileno (PET), la cual fue colocada a -20 °C hasta acumular todas las muestras de agua residual en el periodo de muestreo.



Fig. 2.3. Cárcamo recolector de agua residual generada en la Unidad Porcícola del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, de la Universidad Autónoma de Yucatán.

2.2.2- Medición de la temperatura, pH, conductividad eléctrica y contenido de oxígeno disuelto

El pH, conductividad eléctrica y contenido de oxígeno disuelto fueron registrados inmediatamente después de la recolección de la muestra con un equipo multiparamétrico marca Hach (HQ440d Multi, Hach, EUA) en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Agua del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Estas determinaciones fueron registradas hasta que cada una de las lecturas en el instrumento fuera constante.

2.2.3- Medición de amonio

Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente durante 24 horas para permitir la sedimentación de los sólidos suspendidos. Se tomaron 25 mL del sobrenadante de la muestra y se colocaron por triplicado en matraces aforados de 50 mL. Posteriormente, se añadieron 0.05 mL de tartrato de sodio y potasio (J.T Baker) y 0.5 mL del reactivo de Nessler (J.T Baker), procurando agitar bien la muestra. Para la curva de calibración, se preparó una solución concentrada de cloruro de amonio (Sigma-Aldrich) a 1290 ppm. La curva de calibración consistió en 15 puntos, con concentraciones de 0.0 a 2.00 ppm de amonio. Las preparaciones fueron colocadas en celdas para espectrofotometría y fueron leídas a 425 nm utilizando un espectrofotómetro GENESYS 20, de la marca Thermo Scientific (USA).

Para la lectura de las muestras, se empleó un factor de dilución de 6 (1 mL de la preparación de cada muestra en 5 mL de agua destilada), y la concentración de amonio fue obtenida mediante la ecuación de la pendiente, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.998$.

2.2.4- Medición de nitratos

Se tomaron 0.5 mL de cada muestra y se colocaron por triplicado en matraces Erlenmeyer. Las muestras fueron mezcladas con 1 mL de ácido salicílico al 5% en ácido sulfúrico concentrado y posteriormente se adicionaron 10 mL de NaOH 4 N. Para la preparación de la curva de calibración, se preparó una solución concentrada de 500 ppm de NO_3 y se generaron 10 puntos de la curva, en concentraciones de 0.0 a 50 ppm. Las muestras fueron leídas a 410 nm en un espectrofotómetro GENESYS 20 de la marca Thermo Scientific (USA), y la concentración de nitratos fue obtenida mediante la ecuación de la pendiente, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.987$.

2.2.5- Determinación de Cu y Zn en agua residual porcina

Se colocaron 15 mL de agua residual porcina en tubos de 50 mL marca Corning. Las muestras fueron colocadas en una ultracentrífuga marca Eppendorf modelo 5128 (Alemania) a 4,000 rpm durante 15 minutos. Se separó el sobrenadante y se agregaron 570 μL de ácido perclórico al 70% (J.T Baker) y 2,540 μL de ácido nítrico al 70% (J.T Baker). Para la digestión de las muestras, fueron colocadas en baño María a 110° marca Thermo Scientific (USA, modelo Presicion 60) durante 1 hora. Posterior a ello, las muestras fueron centrifugadas nuevamente a 4,000 rpm, separando la fracción líquida del precipitado y refrigeradas a -20 ° C hasta el momento de su análisis.

Las muestras fueron leídas por triplicado en un espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin-Elmer modelo AAnalyst 200 (EUA), utilizando como blanco HNO_3 al 1%. Para la curva de calibración, se prepararon soluciones con 0.1, 0.5, 1, 4 y 5 ppm Cu a partir de una solución concentrada de 100 ppm de Cu. Para la curva de calibración de Zn, las soluciones preparadas fueron: 0.1, 0.4, 0.5 y 0.75 y 1 ppm a partir de una solución concentrada de 5 ppm. Las muestras fueron leídas a 213.856 y 324.754 nm para zinc y cobre, respectivamente.

La concentración en mg/L fue obtenida utilizando el valor de absorbancia y empleando la ecuación de la pendiente de la curva de calibración, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.99$.

2.2.6- Exposición de las plantas a tratamientos con agua residual porcina (ARP)

Para la preparación de las soluciones experimentales, se permitió que la muestra concentrada de agua residual porcina pudiera sedimentar en refrigeración, debido a que se desea probar si las plantas de *S. minima* son capaces de remover cobre y zinc de la fase líquida del agua residual porcina. Los tratamientos experimentales se resumen en el Cuadro II-3. La razón por la cual se emplean diluciones de agua residual porcina es debido a que en pruebas previas utilizando el agua residual porcina del 25 al 100% de su concentración original, se encontró que el agua porcina es capaz de causar daños severos en las plantas de *S. minima* en aproximadamente 48 horas (Cuadro 2.3) Las características fisicoquímicas y las concentraciones de iones y elementos de los tratamientos experimentales se resumen en el Cuadro 2.4.

Cuadro 2.3 Descripción de los tratamientos empleados con agua residual porcina

Tratamiento	Descripción
Tratamiento Control 1 (C1)	Agua destilada
Tratamiento Control 2 (C2)	Solución nutritiva de Hoffman (2004)
Agua residual porcina al 10% (ARP10)	Agua residual porcina al 10% en agua destilada
Agua residual porcina al 15% (ARP15)	Agua residual porcina al 15% en agua destilada
Agua residual porcina al 20% (ARP20)	Agua residual porcina al 20% en agua destilada
Agua residual porcina al 25% (ARP25)	Agua residual porcina al 25% en agua destilada

Cuadro 2.4. Características fisicoquímicas y contenido de NH₄ NO₃, Cu y Zn de los tratamientos con aguas residuales porcinas diluidas (del 10% al 25% de su concentración original). B.L.D= Bajo límite de detección.

	pH	Conductividad eléctrica (μS/cm)	Oxígeno disuelto (mg/L)	NO ₃ (mg/L)	NH ₄ (mg/L)	Cu (mg/L)	Zn (mg/L)
C1	6.2	17.27	8.63	0.0000	0.000	B.L.D	B.L.D
C2	7.35	174.667	8.63	0.3318	0.1451	B.L.D	B.L.D
ARP10	7.01	760.33	7.62	0.5130	0.6120	0.10	0.38
ARP15	7.32	1,071.5	7.2	0.7642	0.9158	0.16	0.51
ARP20	7.24	1,420.33	6.5	1.0220	1.2120	0.27	0.85
ARP25	7.36	1,745.67	5.75	1.2733	1.5067	0.39	1.01

Se emplearon 72 recipientes de policarbonato 65 x 65 x 100 mm (largo, ancho alto) y en cada uno se colocaron 200 mL de cada tratamiento experimental, con tres réplicas por tratamiento y día de exposición. En cada recipiente se colocó un total de 10 pares de hojas (20 hojas en total) de *S. minima* previamente lavada y aclimatada (Fig. 2.4).

Tratamiento Tiempo exposición	C1	C2	ARP 10	ARP 15	ARP 20	ARP 25
Día 1						
Día 2						
Día 3						
Día 4						

Fig. 2.4. Descripción del diseño experimental seguido para los ensayos de *S. minima* en agua residual porcina (10%, 15% 20% y 25%). Cada miniatura representa una réplica en cada recipiente con 10 pares de hojas c/u. El tiempo de la exposición fue de 1, 2, 3 y 4 días

2.2.7- Determinación de cobre y zinc en tejidos de *S. minima* expuesta a tratamientos con aguas residuales porcinas

Para la preparación de las muestras, se empleó el método de digestión ácida utilizado en la Sección 2.1.4A del presente capítulo. La determinación de cobre y zinc en los tejidos se realizó del mismo modo que lo anteriormente explicado en la Sección 2.1.4B., pero utilizando los factores de dilución que se muestran en el Cuadro 2.5.

Cuadro 2.5 Factores de dilución empleados en la cuantificación de Cu y Zn en tejidos de plantas expuestas a aguas residuales porcinas (ARP10 a ARP25). El factor de dilución se obtiene de la división del volumen final de la preparación (en mL) entre el volumen de alícuota utilizado (Volumen inicial, en mL), e indica cuantas veces se encuentra diluida una muestra.

Tipo de muestra	Tejido	Factor de dilución
ARP10 a ARP25- Cobre	Hoja	4/2= 2
	Raíz	4/2= 2
ARP10 a ARP25- Zinc	Hoja	5/1= 5
	Raíz	5/1= 5

2.2.8- Crecimiento de *S. minima* expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina: número de hojas, longitud de las raíces, mortalidad de las plantas, biomasa y tasa de crecimiento relativo.

Estos procedimientos se realizaron del mismo modo que los descritos en la Sección 2.1.7. La obtención de la biomasa (peso seco) y el cálculo de la tasa de crecimiento relativo se describe en la Sección 2.1.8.

2.2.9- Respuestas fisiológicas de *S. minima* expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina: Fv/Fm y fuga de electrolitos

La obtención de la fluorescencia de la clorofila fue obtenida de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección 2.1.9. La fuga de electrolitos para ambos tejidos (hojas y raíces) se obtuvo de acuerdo con lo descrito en la Sección 2.1.10.

2.2.10- Presentación e interpretación de los resultados

Los resultados obtenidos fueron graficados utilizando el software Sigma Plot versión 11.0 (Systat Software Inc). Las barras en las gráficas corresponden a la media +/- el error estándar. Para la interpretación de los datos, se realizó un análisis de varianza simple con el software Statgraphics 5.1 Plus (USA) para cada una de las variables estudiadas, seguido de test de comparación de medias de HSD- Tukey con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

CAPITULO III- RESULTADOS Y DISCUSION

3.1- Acumulación de Cu y Zn de *S. minima* ante la exposición a diferentes concentraciones CuSO₄ y ZnSO₄: efectos fisiológicos y de crecimiento”

3.1.1- CONTENIDO DE COBRE EN HOJAS Y RAÍCES

Se encontró una mayor concentración de Cu en las hojas de plantas expuestas a los tratamientos con CuSO₄ que las hojas de plantas control y el contenido de metal fue superior en aquellos tratamientos con mayores concentraciones de CuSO₄ (40 y 80 μM). De la Fig 3.1.1 puede observarse que la mayor concentración de cobre en las hojas fue alcanzada tras el primer día de exposición, mientras que en los días posteriores la toma del metal fue menor. En orden creciente, el contenido de Cu en las hojas de plantas expuestas a los tratamientos de CuSO₄ fue de 0.0298, 0.859, 1.6667 y 2.8969 mg Cu / g PS para los tratamientos control, 20, 40 y 80 μM de CuSO₄ al primer día de exposición

Se encontró que las raíces acumularon una mayor cantidad de Cu que las hojas y que este contenido fue mayor en plantas expuestas a las mayores concentraciones de CuSO₄ (40 y 80 μM). De la Fig. 3.1.1 se puede observar que hubo una rápida toma de Cu en el primer día de exposición, seguida de un ligero aumento en la concentración de Cu al segundo día de exposición, así como una tendencia hacia un equilibrio de la concentración de Cu al cuarto día de exposición. En orden creciente, la concentración máxima de Cu en raíces de plantas expuestas a CuSO₄ fue de 3.05, 3,69 y 4.07 mg Cu/ g PS, para los tratamientos de 20, 40 y 80 μM al primer día de exposición, mientras que para este mismo tiempo, las raíces de plantas control tuvieron una concentración de 0.2988 mg Cu/g PS.

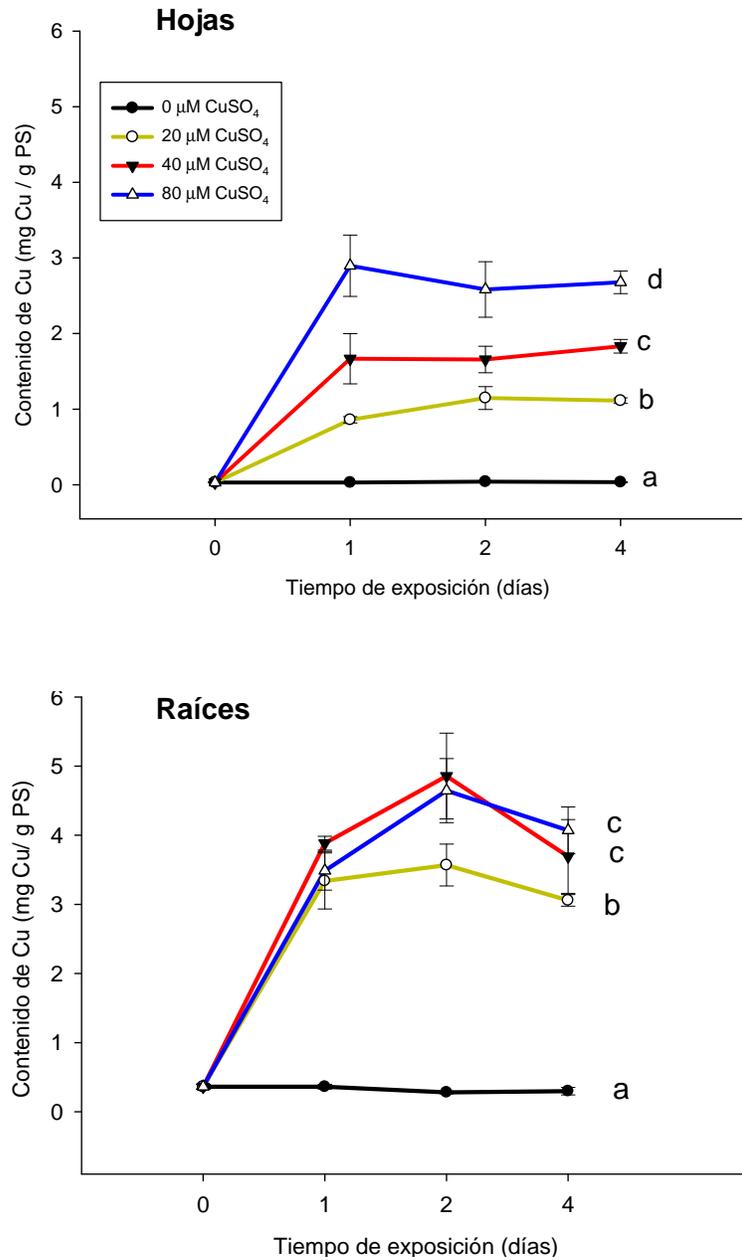


Figura 3.1.1 Contenido de Cu en plantas de *S. minima* expuesta a concentraciones crecientes de CuSO₄ (0- control, 20, 40 y 80 μM). Los puntos graficados corresponden al promedio de tres réplicas. Las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.2- CONTENIDO DE ZINC EN HOJAS Y RAICES

La Fig 3.1.2- muestra el contenido de Zn en hojas de plantas expuestas a los tratamientos de $ZnSO_4$ por 4 días. Se observa que el contenido de Zn en las hojas fue dependiente de la concentración inicial empleada en el medio; de menor a mayor, las hojas de plantas control tuvieron una concentración de 0.21 mg Zn/ g PS, mientras que el contenido de Zn en hojas plantas expuestas a los tratamientos de $ZnSO_4$ fue de 1.5, 2.47, y 8.27 mg Zn/ g PS para los tratamientos de 20, 40 y 80 μM $ZnSO_4$ al primer día de exposición respectivamente

Las raíces de plantas expuestas tuvieron una mayor capacidad de acumulación de Zn en comparación con las hojas, y la mayor concentración de este metal ocurrió en plantas que fueron sometidas a 40 y 80 μM de $ZnSO_4$. En la Fig 3.1.2 puede observarse que el mayor contenido de este metal fue alcanzado durante el primer día de exposición, y que en días siguientes, el contenido de Zn demuestra una tendencia hacia la estabilización. En orden creciente, la concentración de Zn en raíces de plantas fue de 0.18 mg Zn/ g PS., mientras que en raíces de plantas expuestas a Zn, la concentración fue de 4.25, 7.35, y 11.40 mg Zn/ g PS para los tratamientos de 20, 40 y 80 μM de $ZnSO_4$, respectivamente

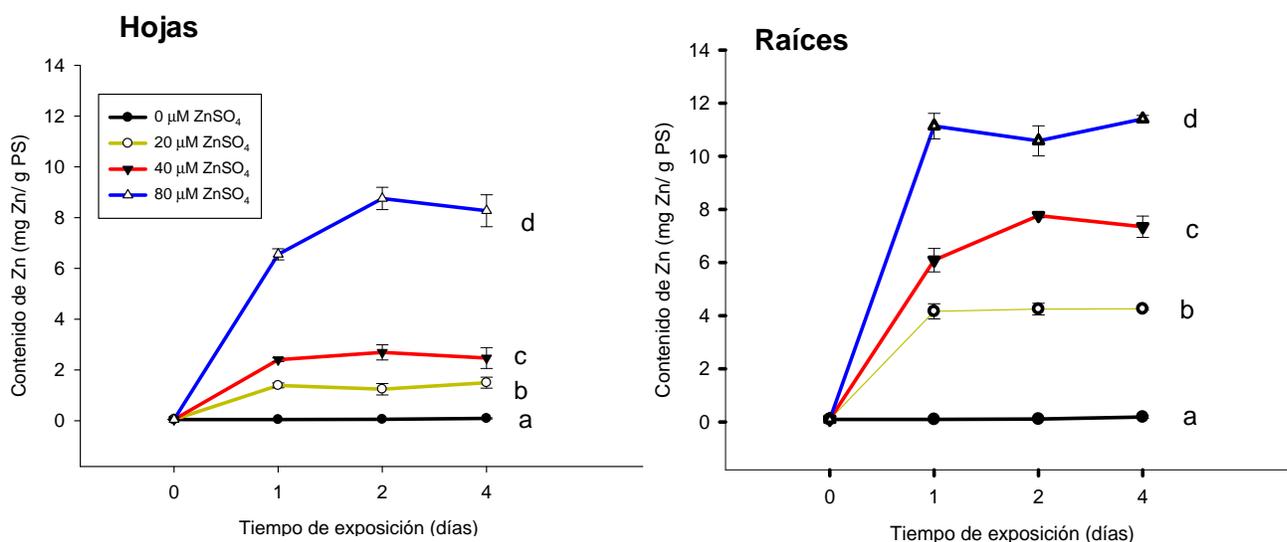


Figura 3.1.2. Contenido de Zn en plantas de *S. minima* expuesta a concentraciones de $ZnSO_4$ (0-control, 20, 40 y 80 μM). Los puntos graficados corresponden al promedio de tres réplicas Las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.3- FACTORES DE BIOCONCENTRACIÓN Y DE TRANSLOCACIÓN

En la Fig.3.1.3 A y B se muestran los Factores de Bioconcentración (FBC) para las plantas expuestas a los tratamientos con CuSO_4 y ZnSO_4 . Puede notarse que en todos los tratamientos de ambos metales el FBC fue mayor que 1000, lo cual confirma la hiperacumulación tanto de Cu como Zn por parte de *S.minima*. (Yoon *et al.*, 2005). Además, los valores del FBC fueron mayores en los tratamientos de Zn que con Cu, lo cual indica que el Zn es mayormente acumulado que el Cu a la misma concentración molar cuando son administrados de forma separada.

En las Fig. 3.1.3 C y D, se presentan los Factores de Translocación (FT) para las plantas expuestas a los tratamiento con de CuSO_4 y ZnSO_4 . Como puede notarse, hubo mayor translocación del metal hacia la parte aérea en los tratamientos con mayor concentración de Cu (40 y 80 μM), mientras que la translocación de Zn fue mayor en plantas expuestas a 80 μM . En ninguno de los casos el valor de FT fue superior a 1, lo cual indicaría que la especie es efectiva para la fitoextracción (Yoon *et al.*, 2005).

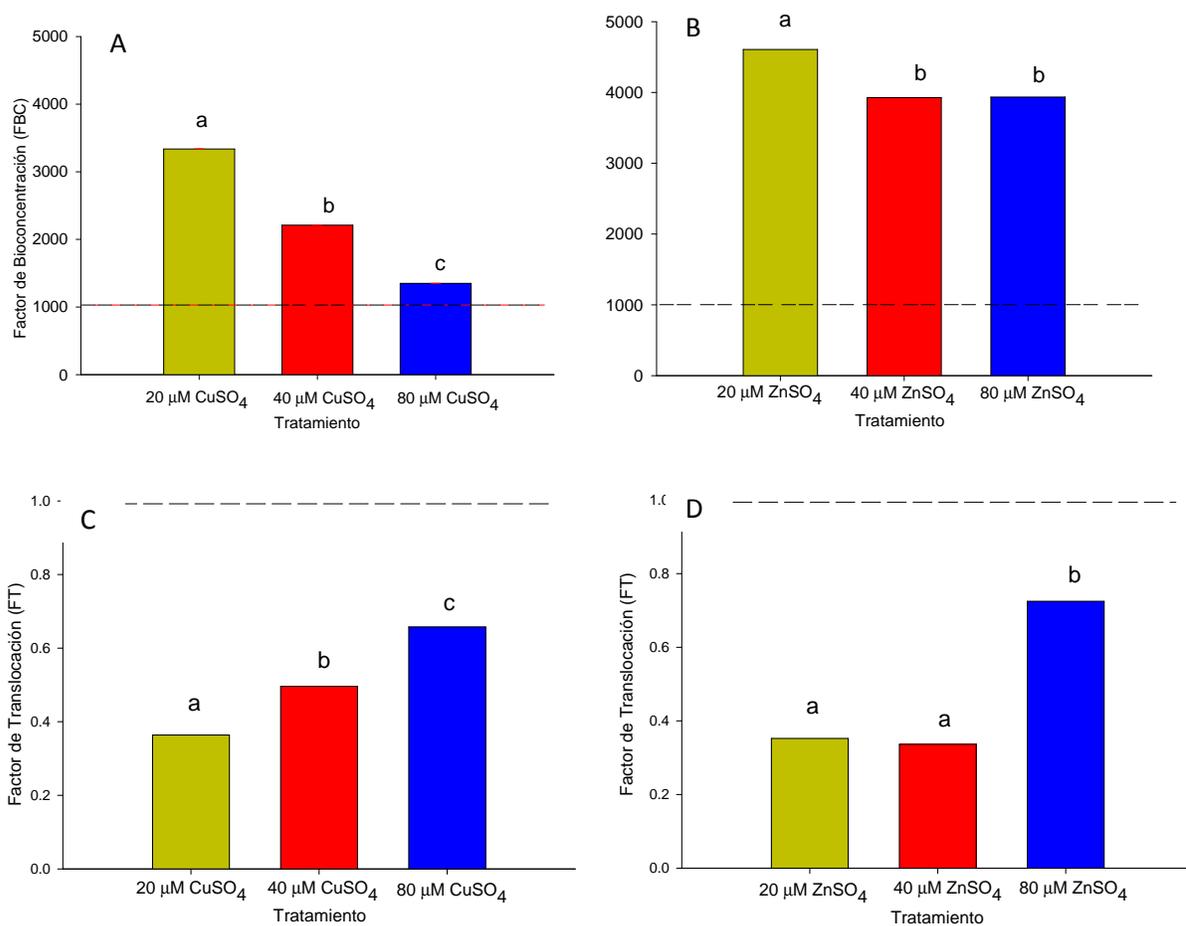


Figura 3.1.3. Factor de Bioconcentración (FBC) y Factor de Translocación (FT) de *S. minima* expuesta a tres concentraciones de CuSO₄ (A y B) y de ZnSO₄ (C y D). Los puntos graficados corresponden al promedio de tres mediciones. Las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.4- ASPECTO FISICO DE LAS PLANTAS EXPUESTAS A COBRE

El aspecto de las plantas en los tratamientos con CuSO₄ no mostró cambios con respecto al tratamiento control después del primer día de exposición. Los primeros signos visibles del estrés fueron apreciables a partir del segundo día de exposición, puesto que plantas sujetas a los tratamientos de 40 y 80 µM CuSO₄ presentaron un cambio en la coloración de las hojas con respecto al control.

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

Este cambio de coloración fue de verde esmeralda a un café cobrizo, mientras que para este mismo tiempo, las plantas en el tratamiento de 20 μM CuSO_4 no lo presentaron. (Fig. 3.1.4). Dicho cambio ocurrió principalmente en las hojas viejas, empezando en ambos bordes externos de las hojas, mientras que la nervadura central cambió de color de forma más tardía. Por otro lado, los brotes laterales en donde esta especie se multiplica presentaron cambios mínimos de coloración.

Para el cuarto día de exposición, el cambio en la coloración de las hojas fue más evidente en los tratamientos con mayor concentración de Cu; estas se caracterizaron por tener hojas parcialmente marchitas y de un color marrón oscuro, lo que es indicativo de un proceso de muerte en la hoja.

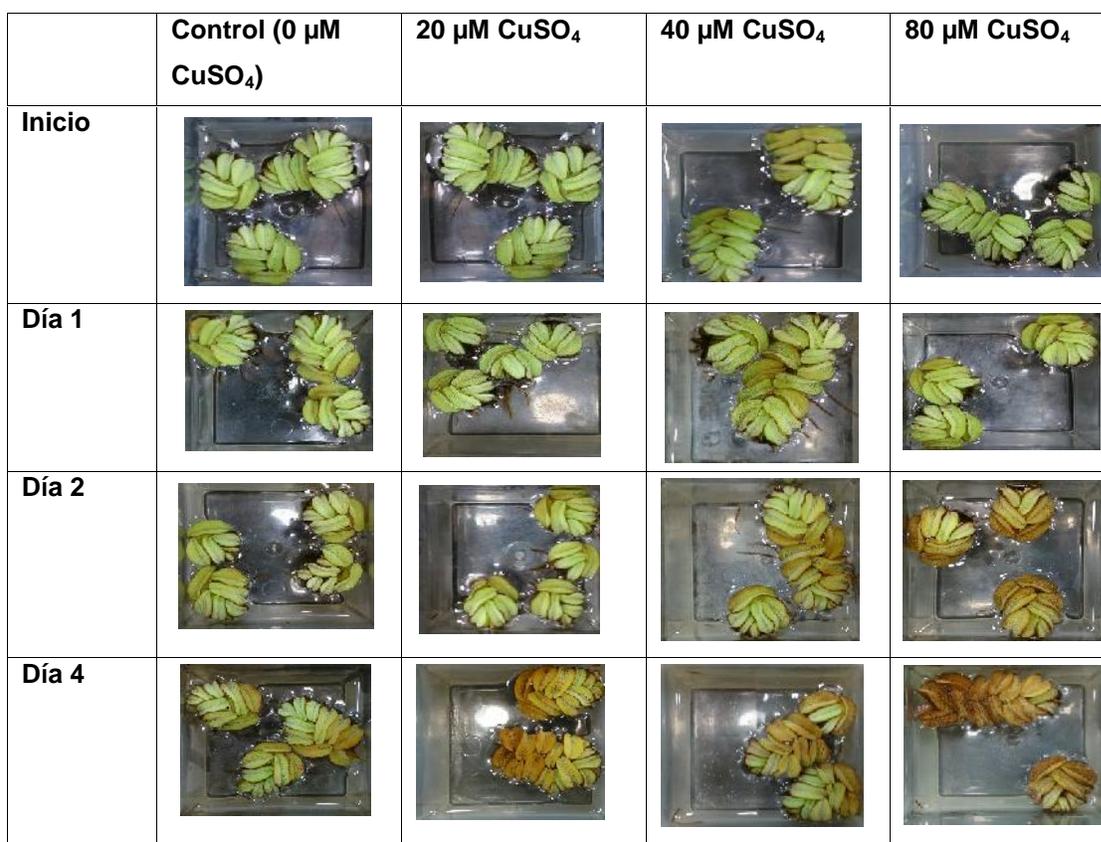


Figura 3.1.4. Aspecto físico de plantas de *S. minima* después de exposición, durante 4 días, a diferentes dosis de CuSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM CuSO_4), en donde puede apreciarse el cambio de coloración en las hojas.

3.1.5- ASPECTO FISICO DE LAS PLANTAS EXPUESTAS A ZINC

El aspecto de las plantas en los tratamientos con ZnSO₄ no mostró cambios visuales en los dos primeros días de exposición de las plantas (Fig.3.1.5). Se observó un ligero cambio en la coloración de las hojas para los tratamientos de ZnSO₄ con respecto al grupo control, el cual fue más marcado en la concentración de 80 µM ZnSO₄. Este cambio se caracterizó por un leve obscurecimiento que comenzó en bordes externos de las hojas viejas, y prosiguió a ocupar mayor superficie. Los brotes laterales y nuevas hojas se vieron menos afectados que las hojas viejas.

	Control (0 µM ZnSO ₄)	20 µM ZnSO ₄	40 µM ZnSO ₄	80 µM ZnSO ₄
Inicio				
Día 1				
Día 2				
Día 4				

Figura 3.1.5. Exposición de *S. minima* durante 4 días a diferentes concentraciones de ZnSO₄ (0, 20, 40 y 80 µM).

3.1.6- NÚMERO DE HOJAS EN PLANTAS EXPUESTAS A COBRE

En todos los tratamientos empleados hubo aparición de hojas nuevas (número inicial de hojas = 20). En la Fig. 3.1.6 se observa que el mayor número de hojas en plantas expuestas corresponde al grupo control, con 26 hojas al final de la exposición, y se encontraron diferencias significativas para los tratamientos de 20, 40 y 80 μM de CuSO_4 los cuales tuvieron al final 26, 24 y 22 hojas, respectivamente.

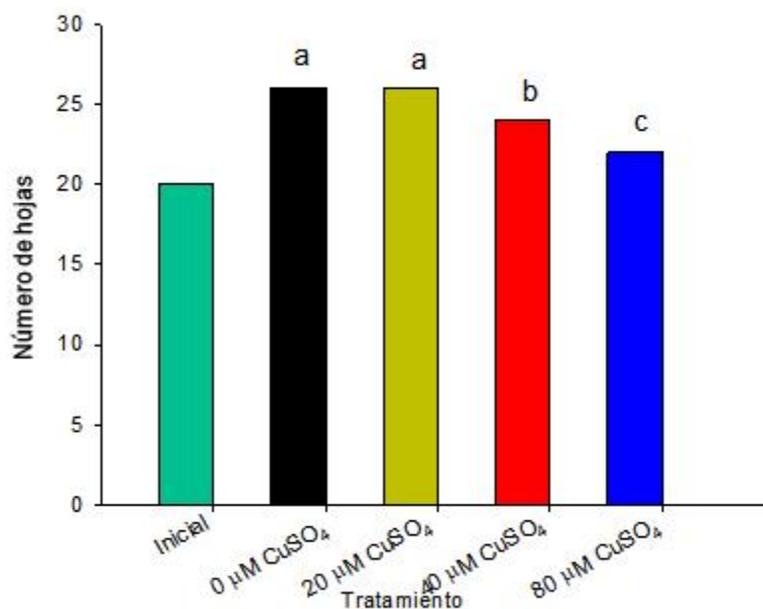


Figura 3.1.6 Número de hojas de *S. minima* expuesta durante cuatro días a diferentes concentraciones de CuSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM). Cada barra representa el promedio de tres repeticiones. Las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.7- NÚMERO DE HOJAS EN PLANTAS EXPUESTAS A ZINC

El mayor número de hojas al final de la exposición de las plantas a los tratamientos con diferentes concentraciones de $ZnSO_4$ fue alcanzado por las plantas sujetas al grupo control, con 27 hojas. En la Fig 3.1.7 se puede notar que el número de hojas en plantas expuestas a diferentes dosis de $ZnSO_4$ fue menor que el control, puesto que tuvieron 24, 24 y 22 hojas para las concentraciones de 20, 40 y 80 μM , respectivamente, con diferencias significativas ($p < 0.05$).

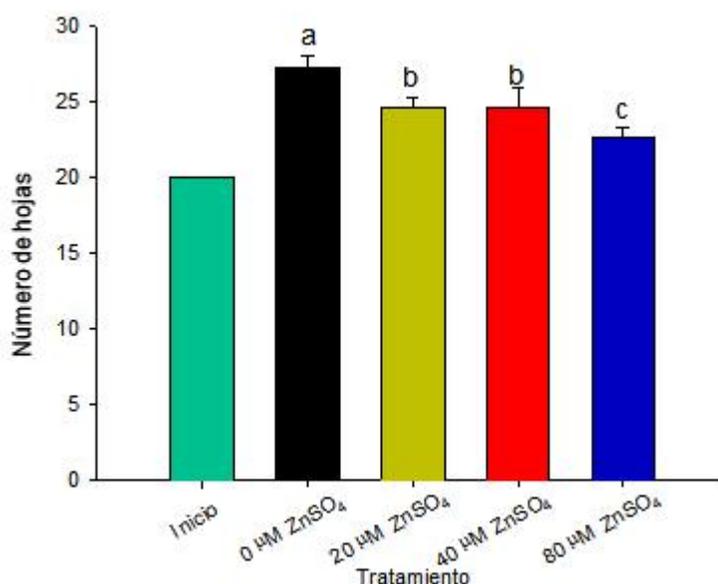


Figura 3.1.7. Número de hojas de *S. minima* expuesta durante cuatro días a diferentes concentraciones de $ZnSO_4$ (0, 20, 40 y 80 μM). Cada barra representa el promedio de tres repeticiones. Las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.8- MORTALIDAD DE HOJAS DE PLANTAS EXPUESTAS A COBRE

La mortalidad de las hojas fue mayor en las plantas sometidas a tratamientos con $CuSO_4$ que en plantas control: En orden creciente, la mortalidad fue de 7.69% para el tratamiento control, y de 28.20 %,52.77 % y 72.72 % para los tratamientos de 20, 40 y 80 μM de $CuSO_4$, respectivamente. Además, se observa claramente que la mortalidad aumenta a medida que la concentración inicial de $CuSO_4$ es mayor (Fig. 3.1.8). y que la

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

concentración de 40 μM CuSO_4 provocó cambios de coloración en la mitad de las plantas cuando estas fueron expuestas durante 4 días.

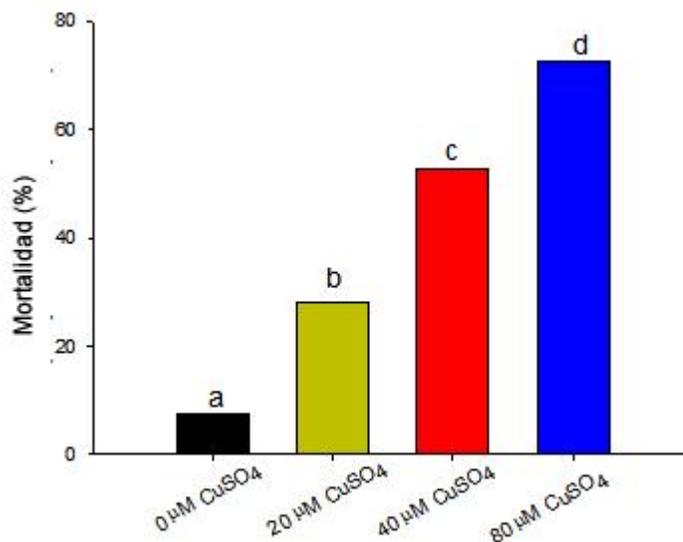


Figura 3.1.8. Porcentaje de mortalidad de *S. minima* expuesta durante tres días a diferentes concentraciones de CuSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM). Cada barra representa el promedio de tres repeticiones. Las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.9- MORTALIDAD DE HOJAS DE PLANTAS EXPUESTAS A ZINC

La mortalidad de las hojas fue mayor en plantas expuestas a tratamientos con ZnSO_4 en comparación con la obtenida del grupo control. De igual forma, se encontró que la mortalidad aumenta a medida de que la concentración empleada de ZnSO_4 es mayor. De menor a mayor, el grupo control tuvo un 11.08% de mortalidad mientras que los tratamientos de 20, 40 y 80 μM de ZnSO_4 tuvieron un porcentajes de 21.36%, 30.41%, y 48.86%, respectivamente (Fig. 3.1.9). Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Finalmente, se obtuvo que la concentración de 80 μM ZnSO_4 provoca cambios de coloración en cerca de la mitad de las plantas cuando estas son expuestas durante 4 días.

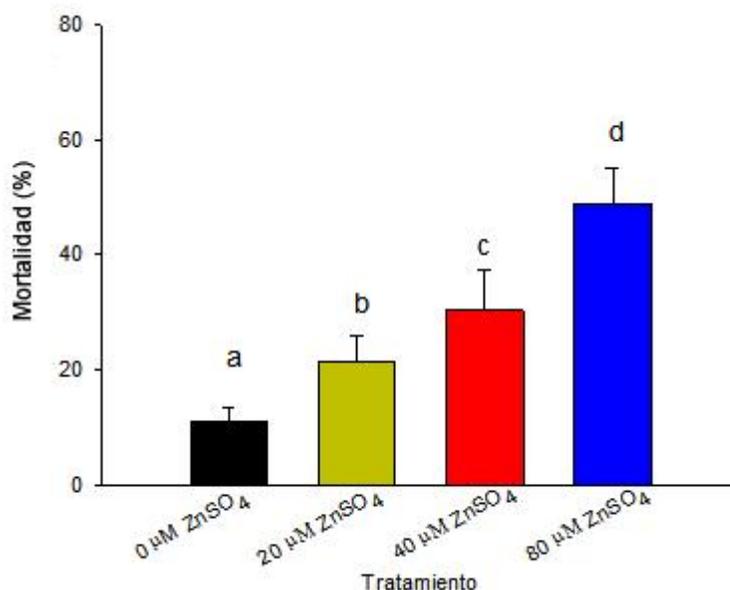


Figura 3.1.9. Porcentaje de mortalidad de *S. minima* expuesta durante tres días a diferentes concentraciones de ZnSO₄ (0, 20, 40 y 80 µM). Cada barra representa el promedio de cinco repeticiones. Las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.10- LONGITUD DE LAS RAICES DE PLANTAS EXPUESTAS A COBRE

La longitud de las raíces fue similar en todos los tratamientos empleados. La longitud promedio fue de 1.82 cm para plantas en grupo control y 1.7, 1.65, 1.57 para los tratamientos de 20, 40 y 80 µM de CuSO₄. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

3.1.11- LONGITUD DE LAS RAICES DE PLANTAS EXPUESTAS A ZINC

La longitud de las raíces fue similar entre tratamientos. En plantas control, la longitud promedio de las raíces fue de 2.70 cm, y para los tratamientos con ZnSO₄ fue de 2.72, 2.52 y 2.52 cm para las concentraciones de 20, 40 y 80 µM, respectivamente

3.1.12- BIOMASA DE PLANTAS DE *S. MINIMA* EXPUESTA A COBRE

La biomasa foliar de plantas sujetas a condiciones control mostró diferencias estadísticamente significativas respecto de la biomasa de hojas de plantas sometidas a los tratamientos con CuSO_4 (Fig. 3.1.10). Comparativamente, la biomasa obtenida en hojas de plantas control, fue 9.87% mayor que la de las plantas expuestas a $20 \mu\text{M}$, y 22.13% mayor a la biomasa de plantas expuestas a $80 \mu\text{M}$ de CuSO_4 .

Por otro lado, la biomasa de las raíces de plantas expuestas a 40 y $80 \mu\text{M}$ de CuSO_4 fue menor a la de las plantas del grupo control, mientras que la biomasa de raíces del grupo control mostró similitudes con el tratamiento de $20 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Comparando las biomazas al 4° día de exposición, la biomasa de raíces de plantas sujetas a control fue 17.32% y 30.89% mayor para los tratamientos de 40 y $80 \mu\text{M}$ de CuSO_4 , respectivamente.

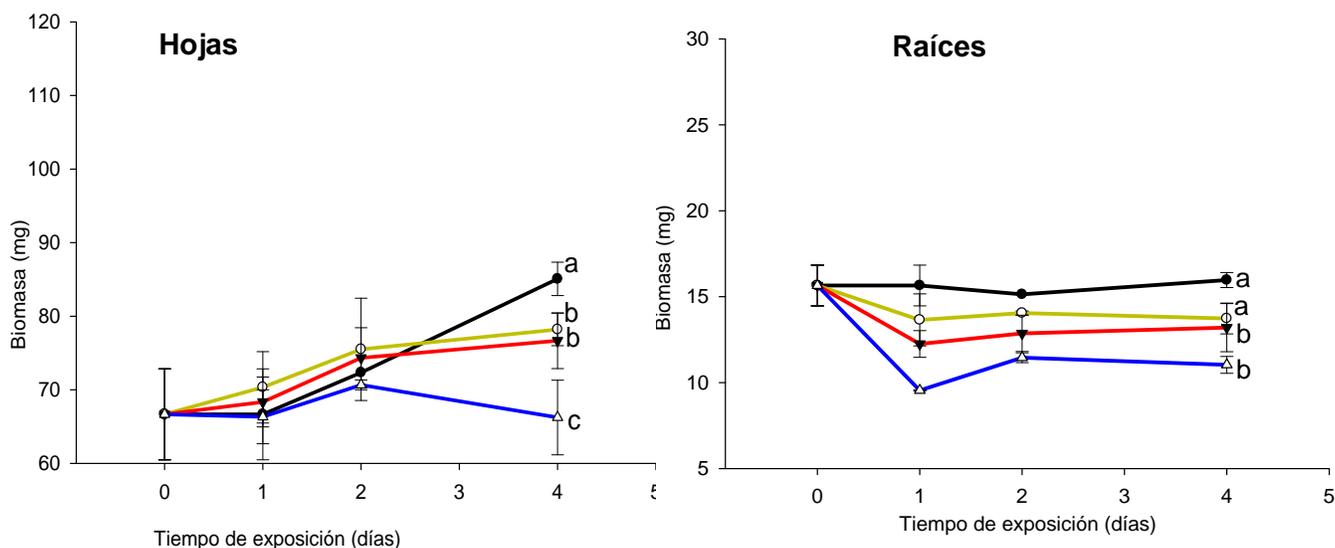


Figura 3.1.10. Biomasa (peso seco) de plantas de *S. minima* expuestas a diferentes concentraciones de CuSO_4 (20 , 40 y $80 \mu\text{M}$). Nota: se utilizó una escala diferente en las dos gráficas con fines de facilitar la visualización de los datos. Los puntos graficados representan el promedio de tres réplicas y las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.13- BIOMASA DE PLANTAS DE S. MINIMA EXPUESTA A ZINC

La mayor biomasa foliar corresponde a plantas expuestas al tratamiento con 20 μM de ZnSO_4 : Comparando la biomasa foliar de plantas control con los demás tratamientos, esta fue 9.07% y 18.22 % mayor que en plantas expuestas a los tratamientos de 40 μM y 80 μM de ZnSO_4 , respectivamente. Por otro lado, la biomasa foliar de plantas sometidas a 20 μM de ZnSO_4 resultó ser 5.85% mayor que la biomasa de hojas de plantas control ($p < 0.01$). En la Fig. 3.1.11, puede notarse que la biomasa foliar de las plantas sometidas al control y a 20 μM de ZnSO_4 incrementa conforme al tiempo de exposición, pero esta situación no sucede para los tratamientos de 40 y 80 μM de ZnSO_4 .

La biomasa de las raíces de plantas sin adición de zinc fue mayor a la biomasa de raíces de plantas expuestas a los tratamientos con ZnSO_4 . En la Fig. 3.1.11 se aprecia un incremento en la biomasa de las raíces de plantas sujetas a condiciones control y a los tratamientos 20 y 40 μM de ZnSO_4 , mientras que no se encontró crecimiento en la biomasa de raíces en plantas expuestas a 80 μM de ZnSO_4 . Comparativamente, la biomasa de las raíces en plantas no expuestas al zinc fue 26.30% mayor respecto a la biomasa de las raíces de plantas bajo la mayor concentración de ZnSO_4 empleada en el presente estudio. Para los tratamientos de 20 y 40 μM de ZnSO_4 se obtuvo una biomasa similar grupo control.

Se encontraron diferencias entre la biomasa del primer y cuarto día de exposición, siendo mayor la biomasa al final del tiempo de exposición para todos los tratamientos, exceptuando el tratamiento de 80 μM de ZnSO_4 . Se encontraron también diferencias estadísticamente significativas entre la biomasa de plantas control vs biomasa de plantas sujetas a tratamientos con ZnSO_4 para ambos tejidos estudiados.

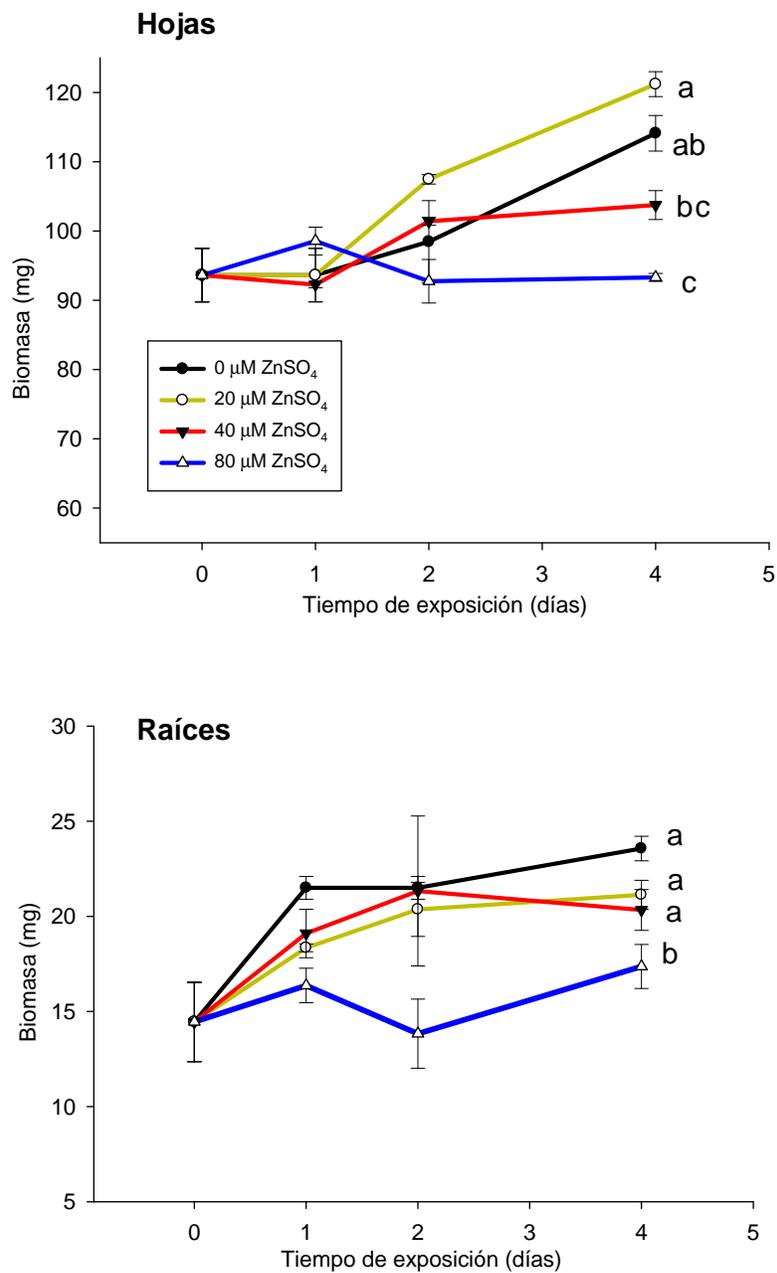


Figura. 3.1.11. Biomasa (peso seco) de plantas de *S. minima* expuestas a diferentes concentraciones de ZnSO₄ (20, 40 y 80 μM). Nota: se utilizó una escala diferente en las dos gráficas con fines de facilitar la visualización de los datos. Los puntos graficados representan el promedio de tres réplicas y las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.14- TASA DE CRECIMIENTO RELATIVO EN PLANTAS EXPUESTAS A COBRE

La mayor tasa de crecimiento relativo se obtuvo en plantas sujetas a condiciones control, (0.05 mg/g día). En la Fig. 3.1.12 se puede observar que la tasa de crecimiento relativa disminuye dependiendo de la concentración inicial de CuSO_4 a la que las plantas fueron expuestas: en orden decreciente, la tasa de crecimiento relativo para los tratamientos con CuSO_4 fue de 0.027, 0.0219 y -0.015 mg/g día para 20, 40 y 80 μM de CuSO_4 , respectivamente. Como puede observarse, la tasa de crecimiento relativo para el tratamiento de 80 μM de CuSO_4 fue negativa, lo que indica que este tratamiento resultó destructivo para las plantas

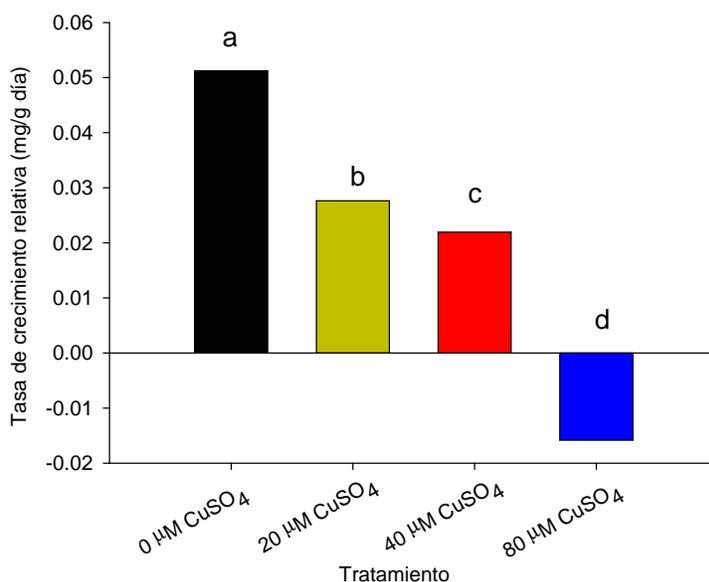


Figura 3.1.12. Tasa de crecimiento relativo de *S. minima* expuesta a tres concentraciones de CuSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM). Los puntos graficados representan el promedio de tres réplicas y las barras de error corresponden al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.15- TASA DE CRECIMIENTO RELATIVO EN PLANTAS EXPUESTAS A ZINC

La tasa de crecimiento relativa en plantas sujetas a 20 μM de ZnSO_4 fue similar a la obtenida del grupo control. (Fig. 3.1.13). Como puede notarse, la tasa de crecimiento relativa disminuyó cuando la concentración de ZnSO_4 empleada en los tratamientos fue mayor. De la Figura se aprecia que la máxima tasa de crecimiento se obtuvo en los tratamientos control y 20 μM de ZnSO_4 , con 0.06 y 0.07 mg/g día, y a partir de esta concentración, se obtuvo una reducción en la tasa de crecimiento. La tasa de crecimiento relativa de los tratamientos 40 y 80 μM de ZnSO_4 fue de 0.034, y 0.005 mg/g día, respectivamente.

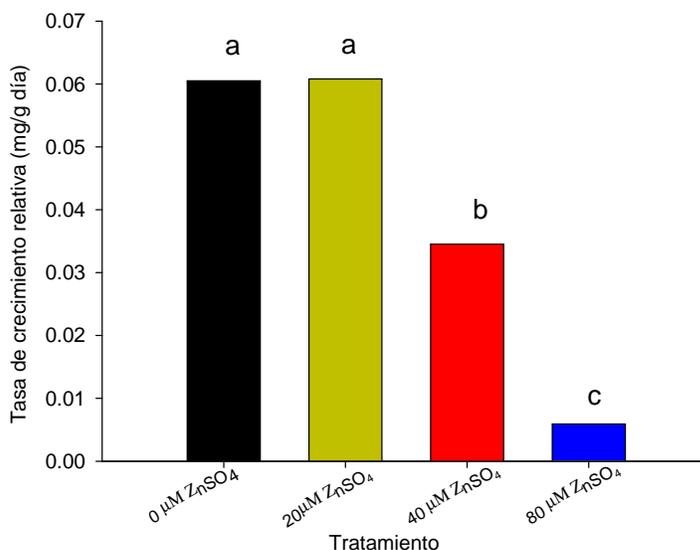


Figura 3.1.13. Tasa de crecimiento relativa de *S. minima* expuesta a tres concentraciones de ZnSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM). Los puntos graficados representan el promedio de tres réplicas y las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.16 FLUORESCENCIA DE CLOROFILA EN PLANTAS EXPUESTAS A COBRE

Se encontraron diferencias entre el valor de eficiencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m) al primer día de exposición y el obtenido al cuarto día de exposición para las plantas expuestas a los tratamientos con CuSO_4 . En la Fig. 3.1.14, este descenso se muestra más marcado en plantas expuestas a $80 \mu\text{M}$ de CuSO_4 , el cual mostró una tendencia a disminuir en tiempos de exposición más prolongados, mientras que para los demás tratamientos con CuSO_4 el descenso en esta variable fue menor. Las plantas sujetas a condiciones control tuvieron una $F_v/F_m = 0.7706$, mientras que plantas expuestas a 20 , 40 y $80 \mu\text{M}$ de CuSO_4 presentaron valores de 0.7427 , 0.7347 , 0.6272 , respectivamente. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p < 0.001$)

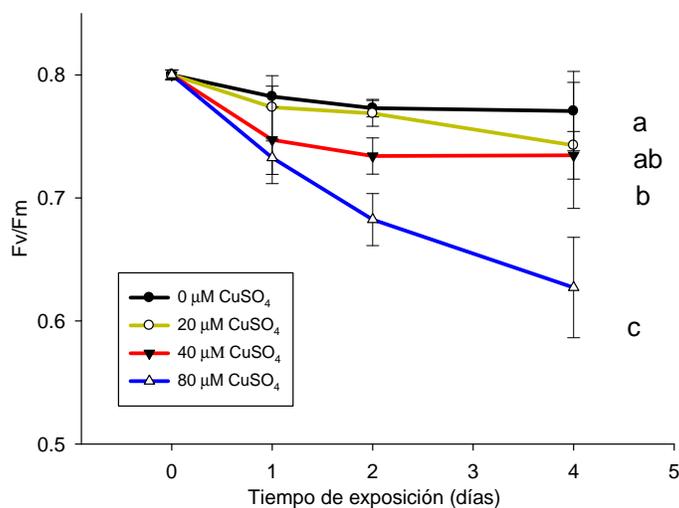


Figura 3.1.14. Eficiencia máxima del fotosistema II (F_v/F_m) de *S. minima* expuesta a diferentes concentraciones de CuSO_4 (0 , 20 , 40 y $80 \mu\text{M}$) durante 4 días. Los puntos graficados corresponden al promedio de 5 repeticiones en 3 réplicas. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.17- FLUORESCENCIA DE CLOROFILA EN PLANTAS EXPUESTAS A ZINC

Se encontraron diferencias entre el valor de F_v/F_m al primer día de exposición y el obtenido al cuarto día de exposición únicamente para las plantas expuestas a los tratamientos con 40 y 80 μM de ZnSO_4 . En la Fig. 3.1.15 se observa que el valor de F_v/F_m en las plantas expuestas al tratamiento control y al tratamiento con 20 μM se mantuvo estable durante todo el experimento, mientras que las plantas expuestas a los tratamientos de 40 y 80 μM ZnSO_4 tuvieron una F_v/F_m menor. Para el cuarto día de exposición, las plantas en grupo control tuvieron una F_v/F_m de 0.78, mientras que los tratamiento con ZnSO_4 mostraron una $F_v/F_m = 0.7865, 0.7515$ y 0.7066 para 20, 40 y 80 μM ZnSO_4 , respectivamente. Las diferencias encontradas resultaron ser estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

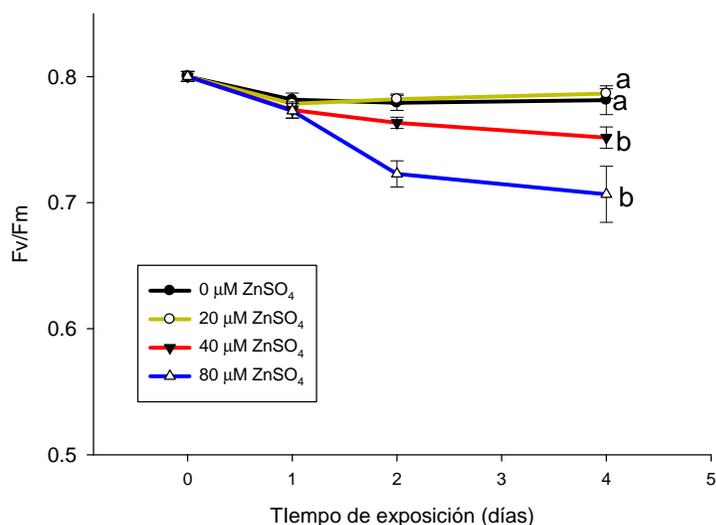


Figura 3.1.15. Fluorescencia de la clorofila (F_v/F_m) de *S. minima* expuesta a diferentes concentraciones de ZnSO_4 (0, 20, 40 y 80 μM) durante 4 días. Los puntos graficados corresponden al promedio de 5 repeticiones en 3 réplicas. Las barras indican el error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.18- FUGA DE ELECTROLITOS EN PLANTAS EXPUESTAS A COBRE

En la Fig. 3.1.16 se presentan los porcentajes de fuga de electrolitos para las hojas de plantas expuestas a CuSO_4 . Se aprecia que la fuga de electrolitos de plantas control se mantuvo sin cambios aparentes a lo largo del tiempo de exposición, mientras que las plantas bajo los tratamientos con cobre mostraron un incremento en esta variable alrededor del segundo día de exposición. Del mismo modo, puede apreciarse que la fuga de electrolitos fue mayor dependiendo de la concentración inicial de CuSO_4 en el medio, encontrándose valores más altos en los tratamientos con 40 y 80 μM de CuSO_4 . Para el cuarto día de exposición, se presentó una reducción en la fuga de electrolitos para las plantas expuestas a los tratamientos con el metal (20, 40 y 80 μM de CuSO_4); no obstante, en todos los casos fue superior a la obtenida en el grupo control. El porcentaje de fuga de electrolitos al cuarto día de exposición en hojas de plantas expuestas a condiciones control fue de 11.43%, mientras que los tratamientos con 20, 40 y 80 μM CuSO_4 tuvieron porcentajes de 15.26%, 17.15% y 22.72% respectivamente, que equivalen a una fuga de 1.3, 1.5 y 1.98 veces el porcentaje de fuga encontrado en hojas de plantas control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

La fuga de electrolitos en raíces de plantas expuestas a los tratamientos con CuSO_4 fue significativamente superior a los valores alcanzados por raíces de plantas control ($p < 0.001$). De la Fig. 3.16, se observa que la fuga de electrolitos de los tratamientos con CuSO_4 tuvo valores máximos al primer día de exposición. Estos valores fueron de 23.00 % en raíces de plantas control, mientras que las raíces de plantas crecidas en los tratamientos con CuSO_4 tuvieron un porcentaje de fuga de 47.94%, 55.35% y 73.05%, para los tratamientos de 20, 40 y 80 μM de este compuesto. Por otro lado, se obtuvo una reducción de esta variable alrededor del cuarto día de exposición para los tratamientos con cobre: en este sentido, el grupo control mostró un 17.43% de fuga, mientras que las raíces de plantas sujetas a los tratamientos con 20, 40 y 80 μM de CuSO_4 tuvieron 31.38%, 49.14% y 67.91% de fuga de electrolitos., lo cual representa una fuga de 1.8, 2.8 y 3.89 veces el porcentaje de fuga encontrado en hojas de plantas control.

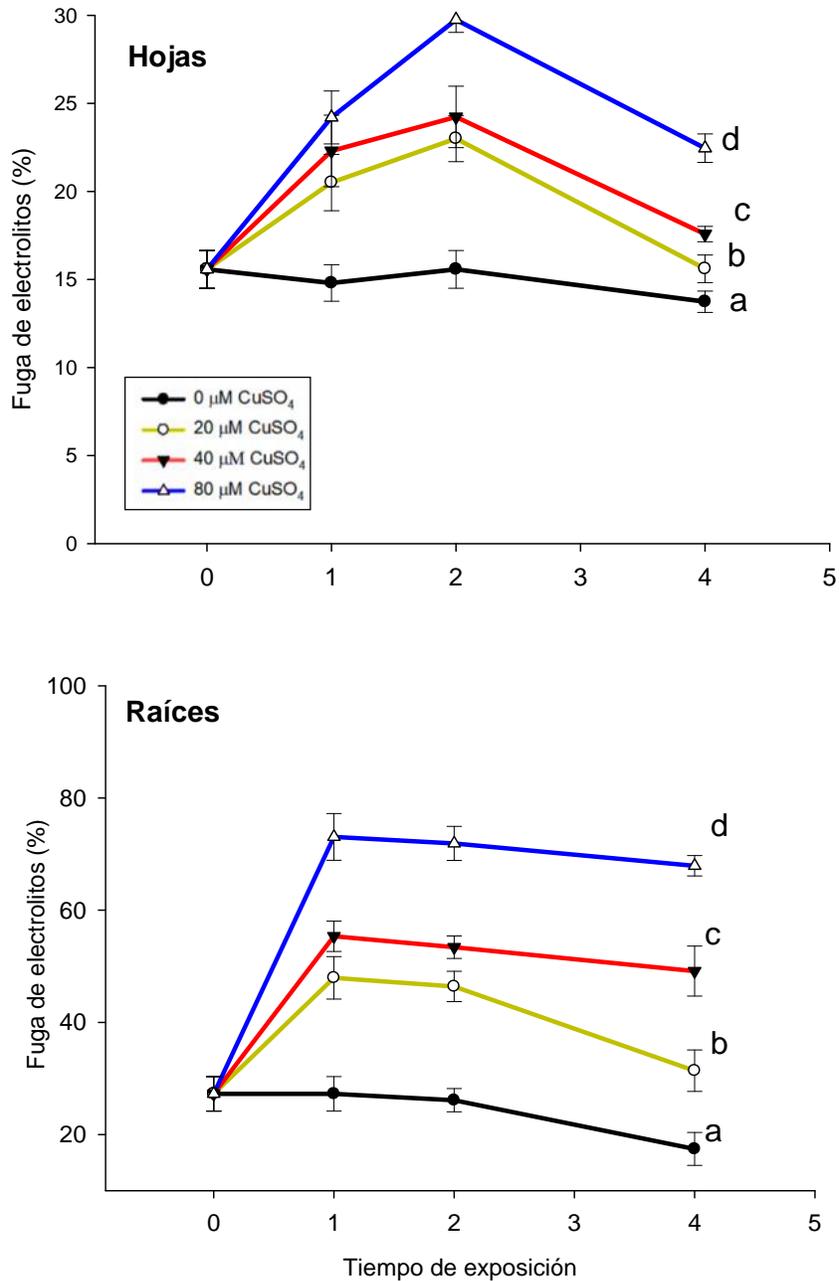


Figura 3.1.16. Fuga de electrolitos en *S. minima* expuesta a CuSO₄ (0, 20, 40 y 80 μM) Los puntos graficados corresponden al promedio de 5 repeticiones en 3 réplicas. Nota: se utilizó una escala diferente en las dos gráficas con fines de facilitar la visualización de los datos Las barras indican el error estándar. Las letras designan en donde fueron encontradas diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.1.19- FUGA DE ELECTROLITOS EN PLANTAS EXPUESTAS A ZINC

En la Fig. 3.1.17 puede apreciarse que la fuga de electrolitos fue mayor en plantas expuestas a las mayores concentraciones de $ZnSO_4$, las cuales mostraron máximos valores en torno al segundo día de exposición. Estos valores fueron de 14.77% para hojas de plantas control, y de 16.46 %, 16.84 % y 24.46 % para hojas de plantas crecidas en los tratamientos con 20, 40 y 80 μM de $ZnSO_4$. Para el cuarto día de exposición se presentó una reducción en el porcentaje de fuga de electrolitos; el grupo control presentó un 6.23% de fuga para hojas de plantas expuestas al control, mientras que las hojas de plantas expuestas a Zn tuvieron 7.79%, 9.98% y 13.88% para los tratamientos con 20, 40 y 80 μM de $ZnSO_4$, respectivamente. En comparación con el control, estos valores fueron 1.25, 1.6 y 2.22 veces superiores ($p < 0.001$).

En el caso de las raíces, se puede ver de la Fig. 3.1.17 que el máximo porcentaje de fuga se obtuvo en plantas expuestas durante el segundo día a la concentración de 80 μM de $ZnSO_4$, ($p < 0.001$).. De menor a mayor, el porcentaje de fuga de electrolitos en para el primer día de exposición fue de 14.77%, seguido de 20.20%, 19.39 y 33.00% para los tratamientos de 20, 40 y 80 μM de $ZnSO_4$. Para el cuarto día de exposición, hubo una reducción en la fuga de raíces de plantas expuestas, tanto al control como a $ZnSO_4$: el grupo control tuvo una fuga de 5.75%, mientras que en raíces de plantas expuestas a $ZnSO_4$ tuvieron una fuga de 12.20%, 16.30% y 24.50% para los tratamientos de 20, 40 y 80 μM , respectivamente, lo que equivale a una fuga de 2.12, 2.8 y 4.26 veces el porcentaje de fuga encontrado en hojas de plantas control.

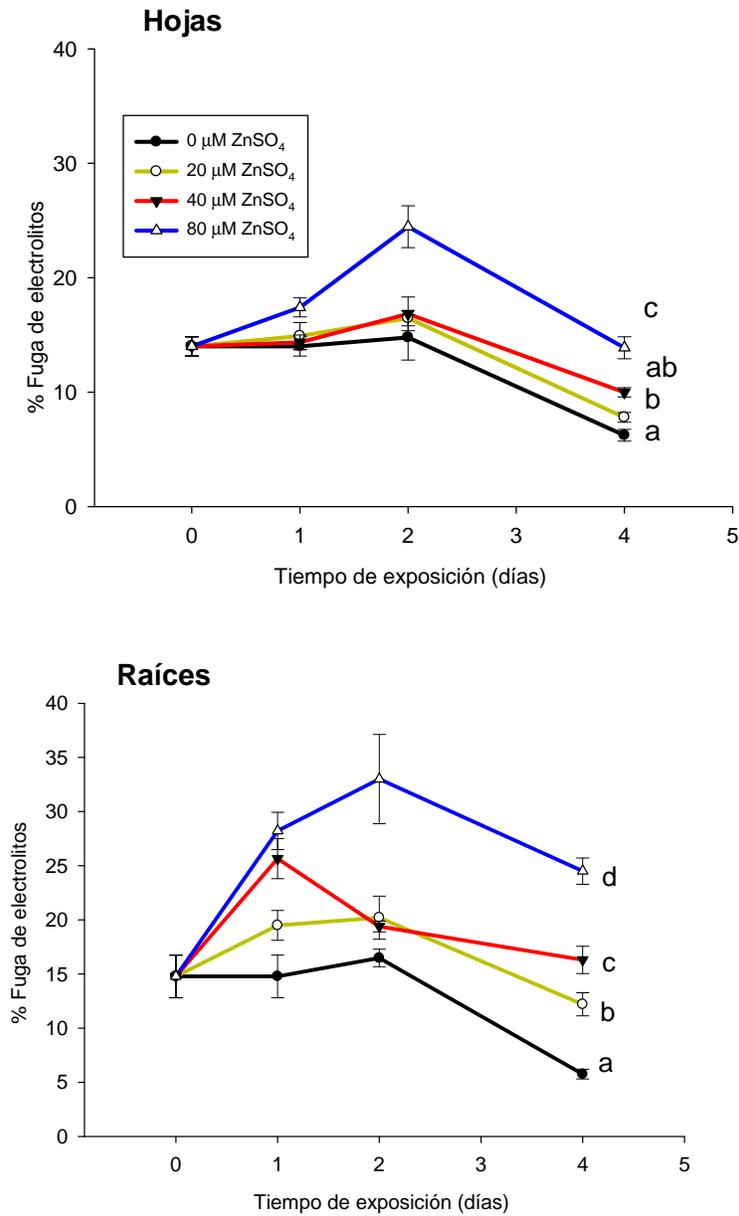


Figura 3.1.17. Fuga de electrolitos en plantas de *S. minima* expuesta a ZnSO₄ (0, 20, 40 y 80 µM). Los puntos graficados corresponden al promedio de 5 repeticiones en 3 réplicas. Las barras indican el error estándar. Las letras designan en donde fueron encontradas diferencias significativas ($p < 0.05$).

DISCUSION DE LA SECCIÓN 3.1

Acumulación de Cu y Zn en tejidos de *S. minima*

Las plantas de *Salvinia minima* acumularon mayores cantidades de Cu y Zn en sus tejidos en los tratamientos con mayor concentración inicial del metal, lo que sugiere que la acumulación de estos elementos es dosis dependiente. El hecho de que las plantas hayan presentado este efecto se debe principalmente a la mayor disponibilidad de los metales en el medio acuoso, ya que otras investigaciones realizadas con *S. minima* y otros elementos metálicos han encontrado esta respuesta; por citar algunos ejemplos: Pb (Hoffmann, 2004) As (Guimaraes, 2012; Hoffmann, 2004,) Ni (Fuentes, 2014) y Cr (Prado *et al.*, 2015).

En especies de *Salvinia*, se ha documentado la acumulación dosis dependiente tanto para Cu y Zn; Azevedo y Peixoto- Henares (2005) encontraron mayor concentración de cobre en plantas de *Salvinia auriculata* que fueron expuestas a 32 y 42 μM de CuSO_4 (en promedio 77.9% más Cu que aquellas plantas expuestas a 2 y 4 μM de CuSO_4) y por otra parte, Das (2016) reporta que el contenido de Cu en plantas de *Salvinia cucullata* que fueron expuestas a 80 μM de CuSO_4 fue 40.32% mayor en comparación de aquellas que recibieron 40 μM de este compuesto. Para el caso del Zn, Iha y Bianchi- Junior (2015) encontraron que plantas de *S. minima* expuestas a 40 μM de ZnSO_4 acumularon 92.72% más Zn que plantas expuestas a 4 μM de este mismo compuesto y Wolff *et al.* (2009) obtuvieron una mayor acumulación de Zn en plantas de *S. auriculata* expuestas a 40 μM de ZnSO_4 en comparación con plantas expuestas a menores concentraciones. Otros autores han encontrado el mismo efecto para otras especies acuáticas, como *Eichhornia crassipes* (Hammad, 2011) y en plantas terrestres como *Hordeum vulgare* (Sridhar, *et al.*, 2007).

Se sabe que el cobre y el zinc se almacenan principalmente en las vacuolas celulares en forma de complejos orgánicos y/o cristales (Ernst, 2006) y que tanto para Cu como Zn existen ciertos compuestos que facilitan la acumulación de elementos en estos organelos, como son las proteínas facilitadoras de difusión de cationes (CDF), ácidos orgánicos (malato, aconitato y oxalato) y fitoquelatinas y metalotioneinas (Mehes-Smith *et al.*, 2013).

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

Esta estrategia ha sido sugerida como una medida para hacer frente a los efectos tóxicos de diversos metales pesados y evitar el daño oxidativo sobre otras estructuras celulares que estos producen (Ernst, 2006), lo cual permite que estos metales sean hiperacumulados en los tejidos hasta cierto grado sin producir efectos indeseados. Esta característica resulta útil en la fitorremediación de los metales, y permite que, en el caso del cobre por ejemplo, la concentración final en los tejidos sea desde 40 veces superior en plantas de *Salvinia natans* (sujetas a 80 μM de CuSO_4) en comparación con el contenido de plantas control (Holtra *et al.*, 2014) y de hasta 105.80 veces, de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, lo que destaca el potencial de dos especies de este género para la absorción de Cu de soluciones líquidas.

En este estudio, la concentración máxima de Cu fue de 6.94 mg Cu/g PS, lo cual se asemeja a lo obtenido por Das (2016) utilizando *Salvinia cucullata* a la misma concentración de CuSO_4 (6.21 mg Cu/g PS). Así mismo, Iha y Bianchi- Junior (2015) encontraron alrededor de 10 mg Zn/g PS en plantas de *Salvinia minima* expuestas a 40 μM de ZnSO_4 , lo cual es similar a lo encontrado en el presente estudio utilizando la misma concentración de este compuesto (9.82 mg Zn/g PS). Sin embargo, estudios con otras especies de *Salvinia* han revelado que el potencial de acumulación puede ser mayor dependiendo del método empleado, ya que para el caso de Cu se ha encontrado una mayor concentración en los tejidos (19 mg/g PS) en plantas de *Salvinia natans* expuestas a 80 μM de CuSO_4 . Estas diferencias pudieron deberse a que estos autores emplearon solución nutritiva en sus tratamientos con Cu en lugar de agua destilada, por lo que se piensa que el contenido de nutrientes podría aumentar la capacidad de acumulación. Así mismo, estos autores emplearon un tiempo de exposición más largo (21 días) y realizaron la renovación del medio nutritivo, lo que valdría la pena tomar en cuenta para futuros estudios con esta especie.

Otro de los resultados encontrados en este estudio fue que la acumulación de Zn por parte de *Salvinia minima* fue mayor que la acumulación de Cu. Este pudo deberse a las diferencias en la capacidad de las plantas para evitar la acumulación excesiva de estos elementos, ya que los requerimientos de metales por parte de las plantas está definido por factores genéticos, así como por los requerimientos de las plantas, la etapa del ciclo de vida del individuo, la tasa de asimilación de los órganos y por la historia evolutiva de la especie (Ernst, 2006).

Adicionalmente, las plantas cuentan con diversos mecanismos para evitar la entrada excesiva de elementos tóxicos (como regulación en la expresión de genes responsables de proteínas transportadoras de metales, inmovilización de los metales por exudados de las raíces, cambios químicos en la pared y la membrana celular, y mecanismos de desintoxicación como metalotioneínas y fitoquelatinas) que difieren entre distintos elementos metálicos. Por estas razones, es posible que *S. minima* posea alguna estrategia para excluir la entrada de Cu, y que por otro lado, la acumulación de Zn ocurra de diferente manera dado a que posee otros mecanismos en la acumulación y exclusión de este metal, que finalmente resulten en una mayor concentración de Zn que de Cu. Sin embargo, con la información obtenida resulta complicado explicar este comportamiento, por lo que se requieren de más elementos para poder ofrecer una explicación más detallada.

El Factor de Bioconcentración máximo obtenido para Cu y Zn fueron superiores al criterio de hiperacumulación de FBC 1,000 establecido por McKone, *et al.* (2007), lo cual indica un buen potencial para la hiperacumulación de estos metales en los tejidos. Lo anterior coincide con lo reportado en otros estudios con especies de *Salvinia* ante concentraciones similares a las empleadas: en el caso de cobre, se ha encontrado un FBC= 3,800 para *Salvinia natans* (Holtra *et al.* 2014) y de FBC= 1,242.2 en *Salvinia cucullata* (Das, 2016), expuestas a 80 μM de CuSO_4 y en el caso de zinc, se ha encontrado un FBC de 1,046 en *S. minima* expuesta a 40 μM ZnSO_4 . (Iha y Biachi-Junior, 2015).

Por otro lado, *S. minima* no cumplió con el criterio de fitoextracción propuesto por Yoon *et al.* (2005), el cual establece que un factor de translocación mayor a 1 indicaría un proceso eficiente de translocación de metales hacia la parte aérea. Este resultado es esperable, puesto que en un proceso de fitoextracción, el agente contaminante es tomado por las raíces y transportado hacia la parte aérea de la planta, y en el caso de *S. minima* se sabe por diversos estudios que la mayor concentración de los metales pesados permanece en las raíces y son transportados en menor medida hacia las hojas (Singh *et al.*, 2012), lo que sugiere que el mecanismo principal es la rizofiltración.

La mayor concentración de Cu y Zn en las raíces se debe a que gran parte de la absorción de elementos metálicos sucede a través de éste órgano. Los compuestos se adhieren mediante enlaces iónicos a la superficie, y posteriormente son transportados

hacia el interior celular por transporte activo, para luego ser almacenados en las vacuolas mediante procesos de quelación (fitoquelatinas y metalotioneinas) (Dhir, 2011). Además, se tiene evidencia de que la expresión de los genes responsables de producir agentes quelantes de metales poseen mayores niveles de expresión en raíces que en hojas, y se sugiere que este hecho confiere una mayor acumulación de estos elementos en este tejido (Mehes-Smith *et al.*, 2013; Ernst, 2006), y por lo anterior se piensa que el mayor contenido de estos metales en raíces de *S. minima* pueda tener relación con la mayor producción de agentes quelantes en las raíces que en las hojas, aunque serían necesarios más estudios en este sentido para conocer más acerca de la capacidad de las raíces para acumular grandes cantidades de metales.

Por otra parte, en plantas hiperacumuladoras, la baja capacidad de translocación constituye una medida para evitar daños en otras partes de la planta (Radulescu *et al.*, 2013). Existen diversos reportes de la acumulación diferencial tanto en plantas acuáticas como terrestres expuestas a altas concentraciones de cobre y zinc: por citar algunos ejemplos en el caso de cobre; *Salvinia cucullata* (Das *et al.* 2016), *Spartina densiflora* (Mateos-Naranjos, 2009), y en el caso de zinc, *Eichhornia crassipes* (Aisen *et al.*, 2010), *Hordeum vulgare* (Sridhar *et al.*, 2007). En el caso de *Salvinia minima*, otros metales como el níquel (Fuentes *et al.*, 2014) y plomo (Leal *et al.*, 2016) han mostrado que se acumulan principalmente en las raíces, mientras que las hojas lograron concentraciones menores de estos elementos, lo que resalta la importancia de este órgano en el proceso de fitorremediación de los metales pesados.

Repercusiones del exceso de cobre y zinc sobre procesos fisiológicos y el crecimiento de *Salvinia. minima*

El cobre y zinc juegan un papel importante en la homeostasis celular dada a su función como elementos estructurales y cofactores enzimáticos. Sin embargo, los niveles requeridos por las células son pequeños en comparación de otros elementos (0.006 mg/g para el Cu y 0.020 mg/g para Zn) y en exceso son causantes de numerosas modificaciones celulares (Kirkby *et al.*, 2007). El caso del Cu, los efectos tóxicos son visibles cuando la concentración en los tejidos rebasa una concentración de 0.02 a 0.03 mg/g, mientras que en el caso de Zn, es de 0.2 y 0.3 mg Zn/g PS (Krämer y Clemens, 2005). Las concentraciones de estos metales en los tejidos en comparación de estos valores de referencia son de 1,100 y 980 veces superior (para cobre y zinc,

respectivamente) por lo que se considera que las plantas sufrieron de los efectos tóxicos de estos metales. Esto pudo comprobarse con las alteraciones producidas sobre las variables fisiológicas y de crecimiento que fueron determinadas, así como la severa transformación del aspecto de las plantas expuestas a altas concentraciones de estos elementos en comparación al estado inicial de las plantas.

En concentraciones relativamente altas, estos elementos provocan la degradación e inhibición de la clorofila (Caspi *et al.*, 1999), así como otros efectos bioquímicos como son la disminución en la producción de sus precursores (ácido aminolevulínico), reemplazo de iones Fe^{+2} y Mg^{+2} de la molécula de clorofila por Cu^{+2} (Stobart *et al.*, 1985), y reducción en el contenido relativo de agua, lo que en su conjunto produce un aspecto clorótico y aumenta la mortalidad de las plantas (Balsberg, 1989). Se piensa que esto pudo contribuir en gran medida al aspecto encontrado en las plantas de *S. minima* que recibieron los tratamientos con mayores concentraciones de Cu y Zn, el cual fue más notable en el caso del Cu dado al elevado porcentaje de mortalidad encontrado en plantas expuestas a mayores concentraciones de este elemento. A pesar de que la concentración de clorofila en plantas expuestas no fue determinada en el presente estudio, es posible que las plantas de *S. minima* expuestas a los tratamientos con mayor concentración de CuSO_4 y de ZnSO_4 sufrieron una reducción de la concentración de clorofila, tanto por degradación como por inhibición en la biosíntesis del pigmento fotosintético. Este efecto ha sido documentado en diversas especies en respuesta a altas concentraciones de cobre y zinc; por citar algunos ejemplos con cobre; *Salvinia cucullata* (Das *et al.* 2016), *Salvinia natans* (Holtra, *et al.* 2014), *Salvinia auriculata* (Bizzo *et al.*, 2014) y en el caso de Zn, *Pistia stratioides* (Mufarrege *et al.*, 2009), *Salvinia natans* (Buta *et al.*, 2014) *Nicotiana tabacum* (Bazihizina *et al.*, 2014) e *Ipomea aquatica* (Chanu y Gupta, 2016).

Por otro lado, la disminución en el contenido y síntesis de los pigmentos fotosintéticos pudo haber contribuido a la reducción de la fluorescencia del fotosistema II, ya que en numerosos estudios con otros elementos metálicos con esta especie han encontrado resultados similares; níquel (Fuentes, *et al.* 2014) y plomo, (Trejo, 2012). Esto ocurre dado que los metales pesados actúan negativamente sobre la cadena de transporte de electrones, ya sea modificando el centro de reacción de PSII, y el complejo receptor de luz por sustitución de iones de Cu y Zn en lugar de Mg y Fe (Küpper *et al.*, 2016), así como por destrucción de polipéptidos asociados al complejo de oxidación del agua, y de otros compuestos donadores y receptores de electrones en la cadena de

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

transporte (Yruela, 2005) como son las proteínas Q_B y Q_A y el citocromo b6/f (Zeiger, 2006).

En cuanto al cobre y zinc, diversos estudios han señalado que la acumulación de ambos elementos es causante de alteraciones en la cadena de transporte de electrones y reducciones en la eficiencia máxima del fotosistema II; en este sentido, Sánchez- Viveros *et al.* (2010), encontraron una disminución de Fv/Fm en plantas de tres especies del género *Azolla* que fueron expuestas a concentraciones de 0.02, 0.2, 1 y 2 mM de $CuSO_4$. Estos autores concluyen que los helechos acuáticos probados son sensibles a la acción del Cu, ya que se registraron valores más bajos de Fv/Fm en plantas que fueron sometidas a la mayor concentración de $CuSO_4$ con una reducción de del 87.5% en plantas expuestas a la mayor concentración del cobre (en comparación con plantas control): Lo anterior representa una evidencia importante, dado a que el género *Azolla* y *Salvinia* son grupos biológicos filogenéticamente emparentados (orden Salviniales) lo que sugeriría la sensibilidad de este grupo al cobre. Esta misma respuesta ha sido encontrada en especies como *Prosopis juliflora* (Michel-López, *et al.* 2016) *Phaseolus vulgaris* (Cook *et al.*, 1998) y en la *Spartina densiflora* (Mateos- Naranjo *et al.* 2008).

Por otra parte, la acumulación moderada Zn no supone un grave daño para el fotosistema II, por lo que el efecto tóxico sólo ocurre a concentraciones elevadas de este elemento: Bazihizina *et al.* (2014) indican que en plantas de *Nicotiana tabacum* expuestas a 250 μM de $ZnSO_4$ no presentaron diferencias en Fv/Fm en torno a plantas expuestas a tratamientos control. Sin embargo, estudios con otras especies han mostrado que concentraciones más elevadas pueden provocar modificaciones en la fluorescencia de la clorofila; tal es el caso de *Paspalum notatum*, que presentó una reducción del 12.82% en Fv/FM cuando se expuso a 400 μM de $ZnSO_4$. (Schuerger *et al.* 2002). Otras especies en donde se ha registrado el descenso de la fluorescencia de la clorofila son: *Beta vulgaris* ante la exposición a 300 μM de $ZnSO_4$ (Sagardoy *et al.*, 2009), y *Oryza sativa* ante la exposición a 4 mM de este compuesto, con reducciones de 7.81% y 25% con respecto al control, respectivamente. Por último, cabe mencionara concentración de zinc empleada en los estudios citados es mucho mayor a la empleada en este estudio, y en nuestro caso, la concentración de 80 μM de $ZnSO_4$ provocó una reducción de Fv/Fm del 10.25% en relación al control, por lo que quizá esta especie es más sensible al zinc que otras de mayor tamaño

Otra de las respuestas fisiológicas encontradas en este estudio fue la creciente fuga de electrolitos tanto en hojas como en raíces. Esto ha sido también reportado en estudios realizados con otros elementos metálicos; por mencionar algunos: cromo (Prado *et al.* 2015), níquel (Fuentes *et al.* 2014), y plomo (Leal *et al.* 2016), y se debe a la formación de especies reactivas de oxígeno a través de una reacción entre superóxido y H_2O_2 , (reacción de Haber-Weis) que provoca cambios en la permeabilidad, organización e integridad de las membranas biológicas (Sandmann y Böeger, 1980) así como la producción de aldehídos tóxicos, inhibición enzimática de diversas vías metabólicas, alteraciones en la producción de ácidos nucleicos, lo impacta negativamente sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. (Perl, 2010).

La severidad con la que el cobre y el zinc pueden afectar las membranas biológicas ha sido estudiada anteriormente por otros autores; Sánchez- Rivero *et al.*, (2010) indican una mayor fuga de electrolitos en tres especies de *Azolla* expuestas a altas concentraciones de cobre (de 0.02 a 2 mM) y concluyen que plantas sometidas a la concentración más elevada presentaron un 60% más fuga de electrolitos que plantas control. Por otra parte, Bizzo *et al.*, (2014) indican diferencias entre el porcentaje de fuga en plantas de *Salvinia auriculata* sometidas a 10 mM de $CuSO_4$ y plantas control (82.76%), lo cual indica que esta especie es vulnerable a altas concentraciones de cobre en el medio. Así mismo, se ha encontrado evidencia de que altas concentraciones de zinc provocan efectos similares; por mencionar unos ejemplos: *Zea mays* expuesta a 5 μM (Kaya *et al.* 2015), *Lemna minor* expuesta a 300 μM (Rádic *et al.*, 2009), *Cajanus cajan* crecida a 1,000 mg Zn/ kg (Garg y Kaur, 2012) y *Citrus reticulata* expuesta a 20 mM de $ZnSO_4$ (Subba *et al.*, 2014). Adicionalmente, algunos de estos estudios reportan aumentos en la producción de aldehídos (malonaldeído, propanal, butanal, hexanal, heptanal y propanal-dimetilacetal) que son productos secundarios de daños a las membranas por peroxidaciones lipídicas y confirmaría el efecto de la degradación de las membranas por acción de estos elementos.

En este estudio, se observaron efectos más adversos en aquellas plantas expuesta al Cu que al Zn; esto pudo deberse a que la actividad redox del cobre ha sido comparada con la del hierro, y han sido reconocidos entre los elementos metálicos con función biológica más reactivos, dado a que poseen dos estados de oxidación (Krämer y Clemens, 2005). Por otro lado, el zinc se considera menos reactivo dado a que solo posee un estado de oxidación y participa en menor magnitud en reacciones de transporte de

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

electrones a comparación de hierro y cobre (Krämer y Clemens, 2005), por lo que representa menores riesgos de toxicidad en plantas, y posee un umbral de toxicidad bastante elevado a comparación de otros elementos metálicos. Por esta razón, cuando se encuentra en altas concentraciones, el cobre presenta una mayor facilidad para reaccionar y ligarse de forma indeseada que el zinc, lo que provoca efectos más negativos que los observados con zinc.

Los resultados fisiológicos obtenidos sugieren que las plantas sufrieron de una combinación de efectos tóxicos provocados por exceso de estos elementos en los tejidos, las cuales impactaron sobre el desarrollo y crecimiento de *Salvinia minima*. Por otra parte, el estrés producido en las concentraciones intermedias (20 y 40 μM) aparentemente no rebasó la capacidad de las plantas para desarrollarse, dado a que se registró poco crecimiento aún bajo estas condiciones, lo cual sugiere que esta especie puede ser tolerante a estas concentraciones. Otro de los efectos de estos metales sobre las células vegetales es la destrucción de los cloroplastos y otros organelos, lo que explicarían el descenso de la actividad del fotosistema II (Al- Hamdani y Blair, 2004). Por otro lado, la toxicidad por estos metales ha sido atribuida a una baja actividad enzimática de ribulosa bifosfato carboxilasa, lo cual podría estar afectando el crecimiento de las plantas por modificación de la asimilación de CO_2 . (Fernandes, 1991). En el caso de la toxicidad por Zn, se ha reportado la restricción en el transporte de azúcares desde las hojas hacia las raíces por formación de calosa en los elementos cribosos del floema (Peterson *et al.*, 1979), y la inhibición de la respiración celular, junto con modificaciones en el metabolismo de C y N (Balsberg, 1989) lo cual explicaría en parte la baja biomasa obtenida en el tratamiento con 80 μM de ZnSO_4 .

En nuestra experiencia, el crecimiento y desarrollo de *S. minima* se vio afectado a partir de una concentración de 20 μM de CuSO_4 y 40 μM de ZnSO_4 y parcialmente inhibido a concentraciones de 80 μM de estos compuestos. La reducción en la capacidad de crecimiento de diversas especies expuestas al cobre y zinc ha sido reportada por algunos autores: Azevedo y Peixoto- Henares (2005) encontraron una reducción del 40.81% en plantas de *S. molesta* expuestas a 32 μM de CuSO_4 durante 7 días de exposición. En otras especies de *Salvinia*, se han encontrado reducciones en la biomasa del 78.33 % en *Salvinia natans* expuesta a 80 μM de CuSO_4 (Holtra, *et al.*, 2014) y de 76.37 % en *Salvinia cucullata* a la misma concentración de este compuesto. (Das, *et al.*, 2016). Este último estudio reporta que el número de hojas y la longitud de raíces se ve

afectada negativamente, ya que plantas expuestas a la concentración más alta tuvieron 50.58% menos hojas que el control y raíces 1.95 veces más cortas que raíces de plantas control. Por otro lado, estudios realizados con otras especies han encontrado que el zinc provoca reducciones en el crecimiento de las plantas; en el caso de plantas acuáticas, se ha registrado reducciones del 50% en *Salvinia auriculata* expuesta a 80 μM de ZnSO_4 y del 44% en el helecho acuático *Azolla filiculoides* expuesta a 40 y 80 μM de este compuesto. Otros ejemplos de reducciones de la capacidad de crecimiento producida por zinc son *Vigna unguiculata* (Singh *et al.* 2014), *Helianthus annuus* y *Sinapis alba* , (Zalewska, 2014).

CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN I

- *Salvinia minima* mostró ser efectiva en la acumulación de Cu y Zn (FBC mayor que 1,000 en todas las concentraciones experimentales). La máxima concentración de Cu encontrada en este estudio fue de 6.96 mg Cu/ g PS y para Zn fue de 19.6 mg Zn/ Cg PS, y se dio en los tratamientos con mayor concentración de dichos metales, lo que nos indica que *S. minima* es capaz de acumular mayor contenido de metal a altas concentraciones iniciales de metal en el medio.
- El Factor de Bioconcentración tuvo valores más altos en los tratamientos con menores concentraciones de Cu y Zn. Este valor relaciona la concentración de los metales en el tejido y la concentración inicial del metal en el medio, e indica que el proceso de fitorremediación es más exitoso a menores concentraciones de estos metales, a pesar de esta especie posee un potencial mucho más elevado para retirar estos elementos.
- El Factor de Translocación fue más elevado a medida que la concentración de Cu y Zn en el medio de los tratamientos fue mayor. Esto indica que las plantas transportan mayor cantidad de estos metales hacia la parte aérea a medida de que la concentración de metal en las raíces incrementa, lo que posiblemente sea una estrategia para que las plantas puedan desintoxicar el exceso de metal a través de la quelación y almacenamiento hacia las vacuolas u otras estructuras celulares.
- La acumulación excesiva de iones de Cu y Zn en los tejidos de *S. minima* provocó efectos negativos sobre la capacidad de crecimiento de esta especie ya que tanto la biomasa foliar, biomasa de raíces y número de hojas fue menor en plantas que recibieron altas concentraciones de estos metales.
- Las plantas de *S. minima* experimentaron un incremento en la mortalidad de las hojas cuando fueron expuestas durante 4 días a altas concentraciones de Cu y Zn, las cuales fueron más notorias en el tratamiento a 80 μ M de CuSO_4 . Se piensa que estos cambios de coloración indicarían un proceso de degradación e inhibición en la síntesis de clorofilas, dado a que es un efecto común de estos metales sobre los

pigmentos fotosintéticos, y habrían conducido a que las plantas presentaran falta de crecimiento en comparación con plantas control.

- Se encontró una importante sensibilidad de la eficiencia fotosintética en respuesta a la acumulación excesiva de Cu y Zn en los tejidos de *S. minima*, por lo que el uso de esta variable representa un buen indicador del estrés causado por exceso de Cu y Zn. Hubo una alteración negativa de Fv/Fm de *S. minima* en respuesta a la exposición y acumulación de Cu y Zn en altas concentraciones, la cual mostró que a mayores concentraciones de estos metales en los tejidos, se presenta una menor eficiencia fotosintética.. Esta respuesta se debe a la destrucción de compuestos importantes de los cloroplastos, así como modificaciones en las membranas de los tilacoides y sobre los complejos receptores de luz, que son efectos comunes del estrés provocado por estos metales en las plantas.
- La acumulación excesiva de Cu y Zn en *S minima* resultó en cambios negativos en cuanto a la permeabilidad de las membranas celulares, lo cual quedó demostrado ya que plantas expuestas a altas concentraciones de estos metales tuvieron mayores porcentajes de fuga de electrolitos, lo cual pudo haber sucedido por la peroxidación lipídica de las membranas causada por la producción de especies reactivas de oxígeno. Así mismo, el porcentaje de fuga de electrolitos fue mayor en raíces que en hojas, dado a que este tejido se encuentra en mayor contacto con el medio, y reciben los daños de los metales de manera más directa.
- La mayor toma del metal ocurrió en las primeras 24 horas de la exposición de las plantas, mientras que en días subsecuentes la acumulación de estos metales mostró ligeros cambios. Además, se encontró que la acumulación de estos elementos tiene un comportamiento bifásico, ya que en días, la toma de metales presenta ligeras fluctuaciones hasta estabilizarse. Adicionalmente, la mayor concentración de los elementos en cuestión se localizó en las raíces, lo que indica la importancia de este órgano en proceso de fitorremediación.
- El mayor grado de estrés en plantas que fueron expuestas a las mayores concentraciones, tanto de Cu como de Zn. Sin embargo, la acumulación de iones de Cu en los tejidos de *S. minima* fue más nociva que la acumulación de iones Zn,

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

puesto que menores cantidades de Cu provocaron efectos más negativos sobre las variables estudiadas que los encontrados en plantas sometidas a los tratamientos con Zn, aun a la concentración más alta evaluada en este trabajo.

- Por último, a través del estudio de las alteraciones fisiológicas producidas por la exposición de las plantas a Cu y Zn sobre las variables estudiadas, se concluye que a pesar del estrés fisiológico producido por los metales, esta especie posee un interesante potencial para ser empleada en futuros esfuerzos de fitorremediación acuática bajo condiciones semi-controladas que son propias de la Región, lo cual cobra mayor importancia si se considera que esta especie es de rápido crecimiento y de propagación sencilla.

3.2 Efectos fisiológicos, de crecimiento y acumulación de Cu y Zn de S. minima ante la exposición a diferentes concentraciones de agua residual porcina

3.2.1- CARACTERIZACIÓN DEL AGUA RESIDUAL PORCINA

En el Cuadro 3.2.1 se presentan los valores promedios de los parámetros fisicoquímicos y concentraciones determinadas en el periodo de colecta del agua residual porcina (del 3 al 11 de febrero de 2016), así como los valores máximos y mínimos obtenidos en este periodo. Los valores por día de medición se presentan en las Figs. 3.2.1a y 3.2.1b.

Cuadro 3.2.1. Valores promedio (n=5) de las condiciones fisicoquímicas del agua residual porcina, obtenidas durante el periodo de recolecta (del 3 al 11 de febrero de 2016) de la Unidad Porcícola del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CCBA—UADY) y de la solución nutritiva de Hoffmann *et al.* (2004), empleada en la aclimatación de las plantas. B.L.D: Bajo el Límite de Detección del equipo (< 0.001 mg/L).

Parámetro	Promedio	Máximo	Mínimo	Solución nutritiva
pH	6.72	7.2	6.24	7.35
Conductividad Eléctrica (µS/cm)	6,409	6,910	4,680	174.64
Oxígeno disuelto (mg/L)	0.274	0.35	0.27	8.63
Nitratos (mg/L)	5.11	6.0	4.5	0.33
Amonio (mg/L)	6.12	8.4	2.4	0.69
Cu disuelto (mg/L)	1.59	1.82	1.28	B.L.D
Zn disuelto (mg/L)	0.59	1.80	0.205	B.L.D

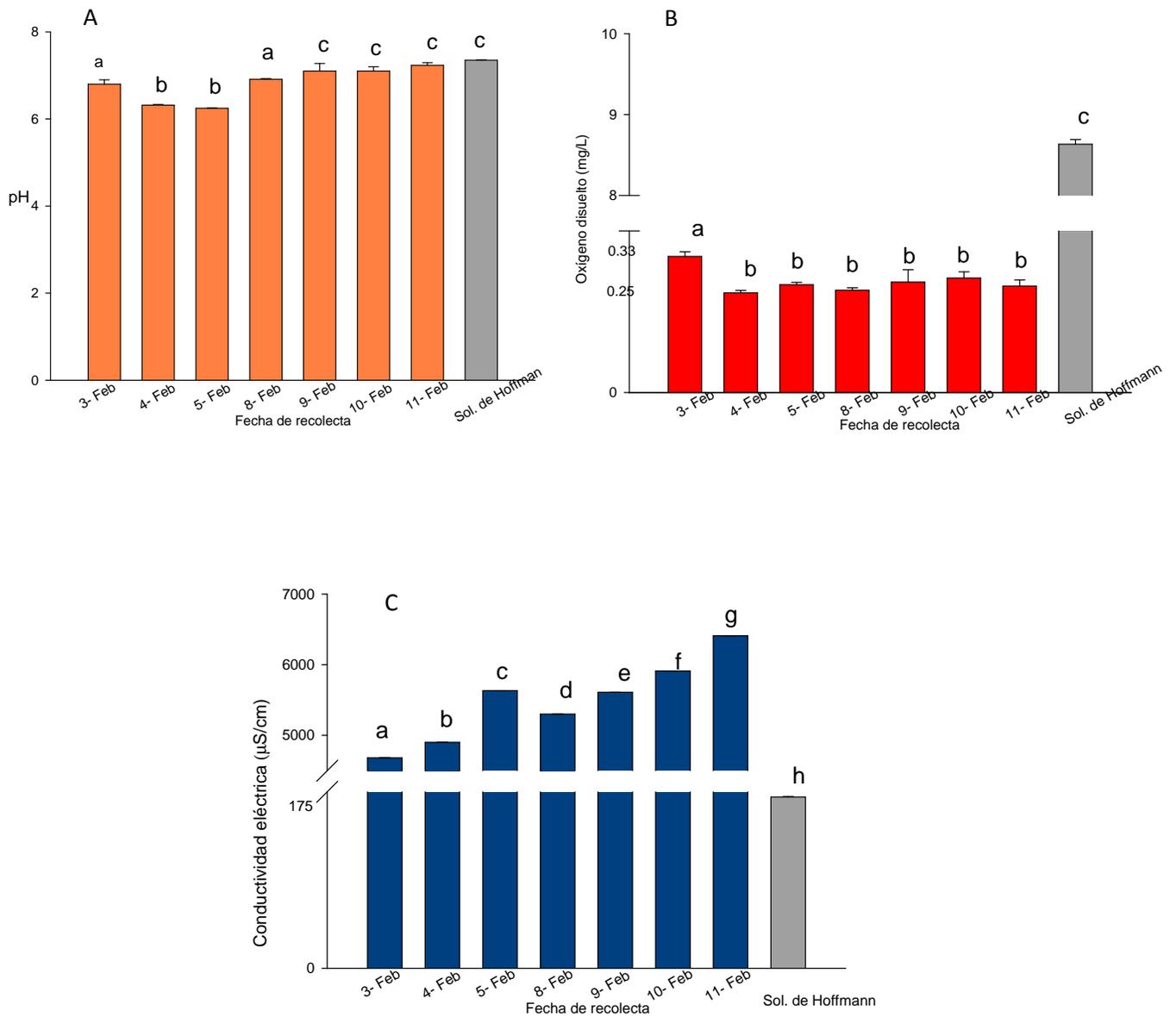


Figura 3.2.1a pH, oxígeno disuelto y conductividad eléctrica del agua residual porcina generada durante la semana de muestreo (del 3 al 11 de febrero de 2016). En color gris, se incluyen los valores de estas variables en la solución nutritiva de Hoffman (2004). Cada barra representa al promedio de 5 mediciones, y las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

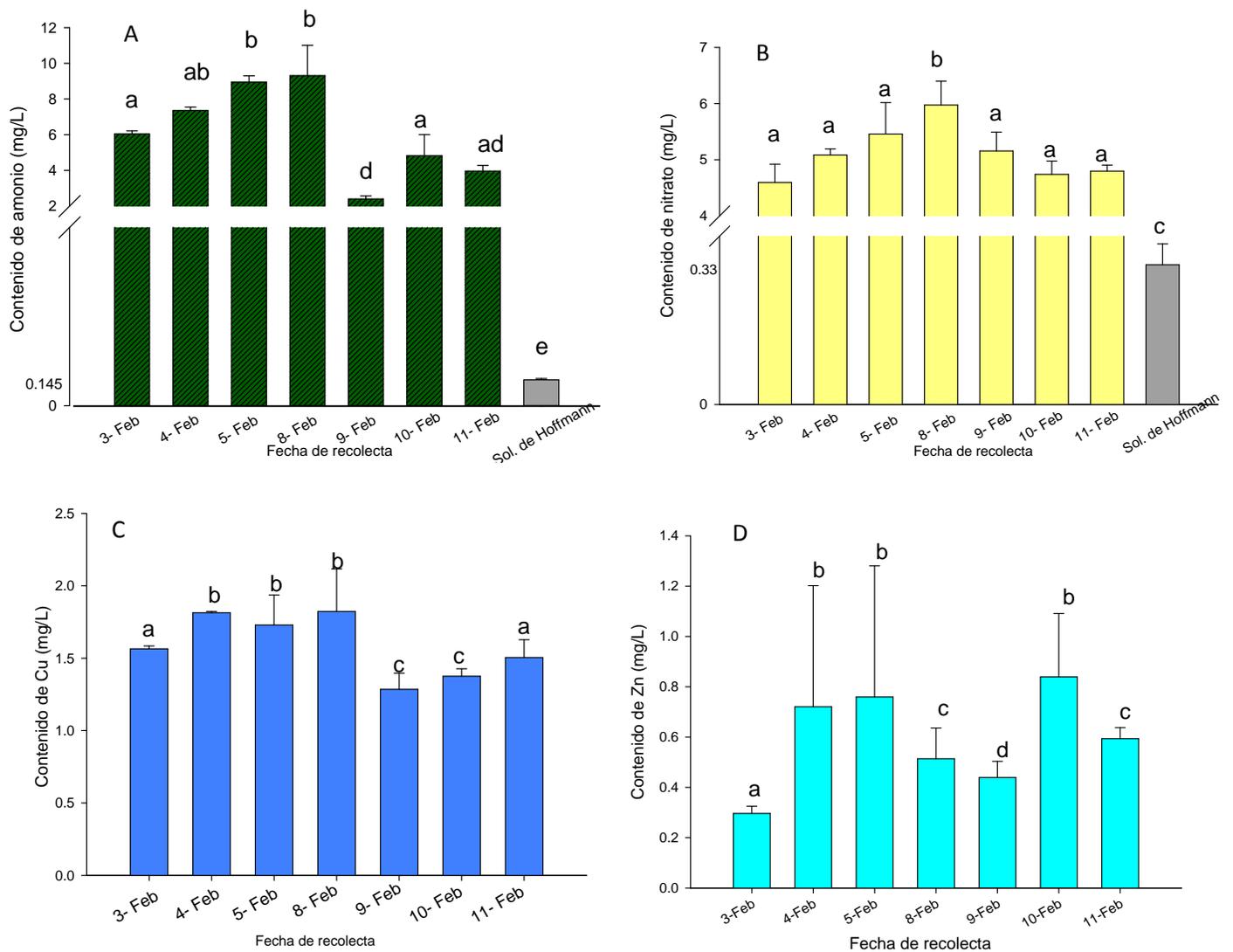


Figura 3.2.1b Contenido de: amonio A), nitratos B), C) Cu y D) Zn, en agua residual porcina generada durante la semana de muestreo (del 3 al 11 de febrero de 2016). En color gris, se incluyen los valores de estas variables en la solución nutritiva de Hoffmann (2004). Cada barra representa al promedio de 5 mediciones, y las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.2.2- CONTENIDO DE COBRE EN HOJAS Y RAICES

El mayor contenido de Cu se obtuvo en hojas de plantas expuestas a los tratamientos ARP20 y ARP25, mientras que los tratamientos ARP 10 y ARP 15 presentaron menor contenido en relación a estos (Fig. 3.2.2). El contenido de Cu en las

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

hojas al final del tiempo de exposición fue de 0.022 y 0.029 mg Cu/g PS para las plantas crecidas en tratamientos agua destilada y medio Hoffmann, respectivamente, mientras que la concentración de Cu en hojas de plantas expuestas a los tratamientos de ARP fue de 0.043, 0.048, 0.045 y 0.049 mg Cu/g PS para los tratamientos ARP10, ARP15, ARP20 y ARP25, respectivamente. Estas diferencias encontradas entre el contenido de Cu en hojas control y en hojas de plantas bajo los tratamientos con ARP fueron estadísticamente significativas ($p < 0.01$).

Se encontró una mayor concentración de Cu en las raíces de plantas expuestas a los tratamientos ARP10 Y ARP15, Estos tratamientos mostraron una clara diferencia con los niveles encontrados en C1 y C2; las raíces de plantas crecidas en C1 y C2, la concentración de Cu fue de 0.154 y 0.216 mg Cu/g PS, respectivamente, mientras que la concentración de este elemento en raíces de plantas crecidas en ARP fue de 0.27, 0.26, 0.21 y 0.23 mg Cu/g PS para los tratamientos ARP10, ARP15, ARP20 y ARP25, respectivamente. La máxima acumulación de Cu en la planta completa fue de 0.31mg Cu/g PS, y fue logrado en plantas crecidas en el tratamiento con ARP10, el cual mostró diferencias significativas en comparación con la acumulación cobre en plantas expuestas a ARP20 y ARP25

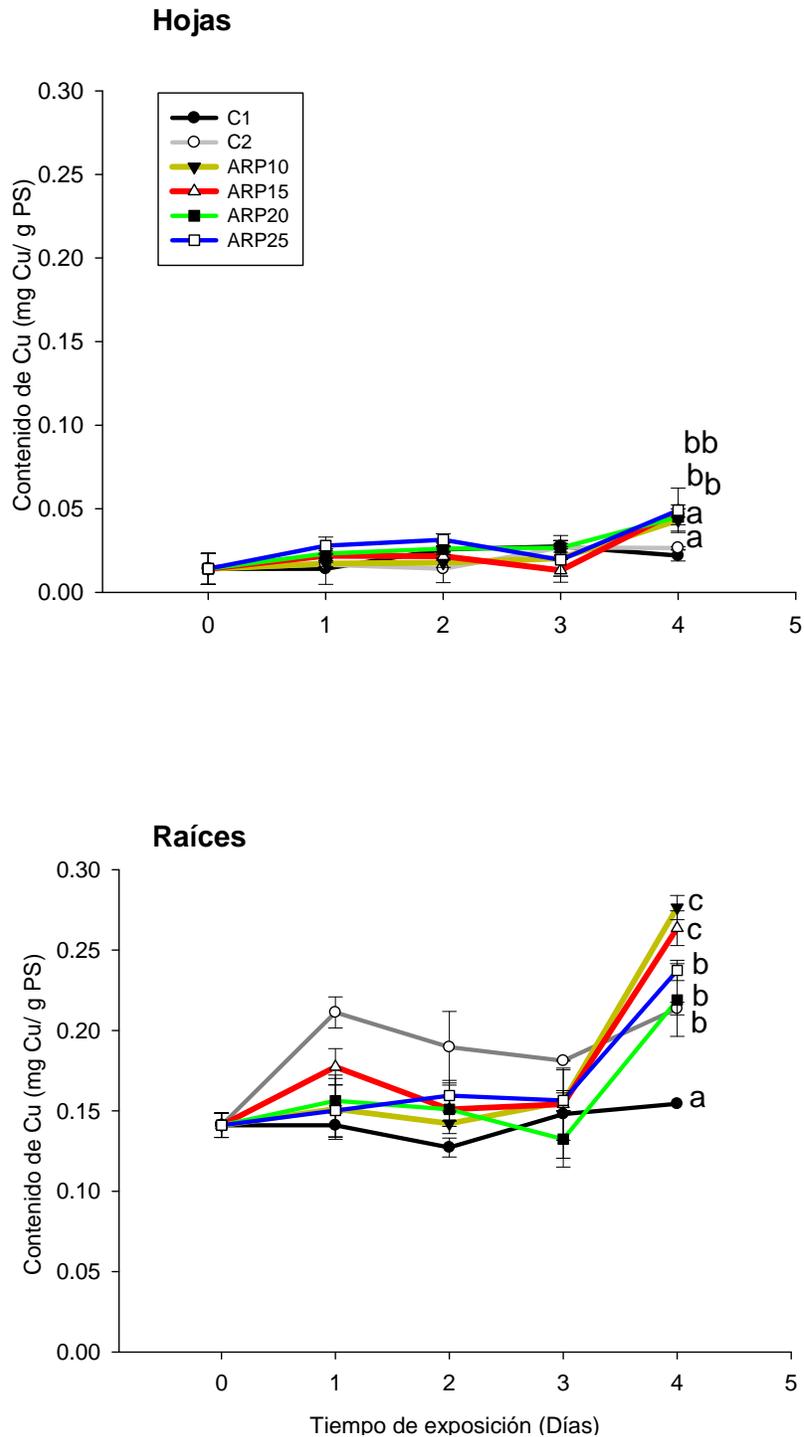


Figura 3.2.2. Contenido de Cu en *S. minima* expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina (10,15 20 y 25%). Los puntos graficados representan el promedio de tres réplicas y las barras al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.2.3- CONTENIDO DE ZINC EN HOJAS Y RAICES

En la Fig. 3.2.3 se observa que el contenido de Zn de hojas de plantas expuestas a C1 mostró claras diferencias respecto de hojas de plantas expuestas a los tratamientos con ARP. Sin embargo, el contenido de Zn en hojas de plantas expuestas a los tratamientos con diferentes concentraciones de ARP fue similar: La concentración de Zn en hojas de plantas expuestas a C1 y C2 fue de 0.048 y 0.057 mg Zn/g PS, respectivamente, mientras que en hojas de plantas sometidas a los tratamientos con ARP el contenido fue de 0.11, 0.115, 0.12 y 0.13 mg Zn/ g PS (para los tratamientos de ARP10 a ARP25 en orden ascendente de concentración).

Por otro lado, las raíces de plantas crecidas en los tratamientos C1 y C2 tuvieron concentraciones de Zn de 0.19 y 0.26 mg Zn/ g PS, respectivamente, mientras que el contenido de Zn en raíces de plantas crecidas en los tratamientos con ARP fue de 0.50, 0.60, 0.49 y 0.60 mg Zn/ g PS, para los tratamientos ARP10, ARP15, ARP20 y ARP25, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de Zn entre tratamientos con aguas residuales porcinas. La máxima concentración de este metal en base a la planta total fue de 0.77 mg Zn/g PS, y se obtuvo en plantas expuestas a ARP25.

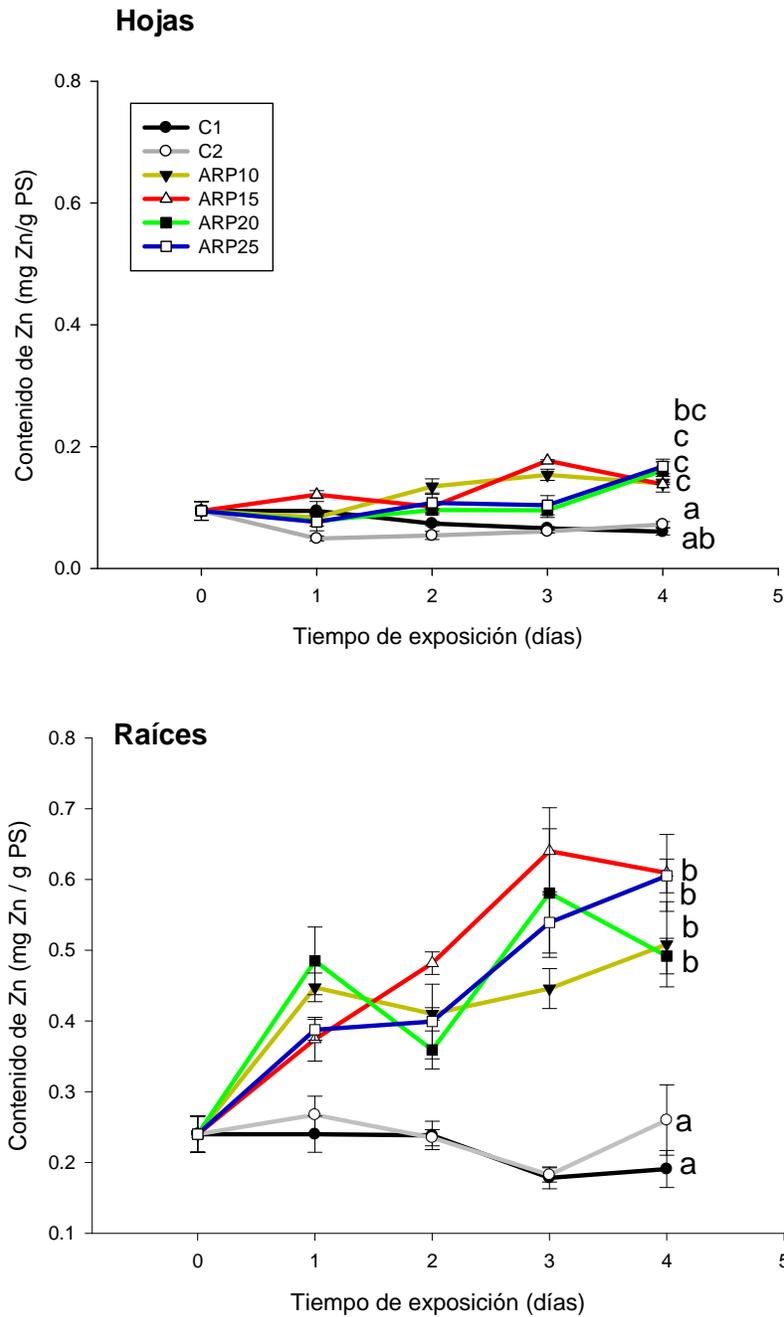


Figura 3.2.3. Contenido de Zn en *S. minima* expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina (10,15 20 y 25%). Los puntos graficados representan el promedio de tres réplicas y las barras al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.2.4- ASPECTO FÍSICO DE LAS PLANTAS EXPUESTAS A DILUCIONES DE AGUA RESIDUAL PORCINA (DE 25% AL 100%)

En la Fig. 3.2.4 se muestra la apariencia de las plantas que estuvieron expuestas durante 4 días a concentraciones del 25% a 100% del agua residual porcina. Al término del primer día de exposición, las plantas expuestas a mayores concentraciones de aguas residuales mostraron cambio de coloración de las hojas, el cual fue de verde esmeralda brillante a un café cobrizo con una ligera tendencia hacia anaranjado, mientras que las plantas control se mantuvieron sin cambios aparentes.

Hacia el segundo día de exposición, las hojas mostraron un color café- negruzco, y tuvieron un aspecto marchito en su totalidad. Esta condición sugeriría que las plantas se encontraban en condiciones de estrés severo, y el comienzo de la muerte de las planta, dado a que ninguna hoja conservó su color original.

Durante los dos últimos días de exposición, el aspecto de la plantas no mostró cambios apreciables; estas plantas mostraron hojas negras en su totalidad y presentaron facilidad para desprenderse del racimo, mientras las raíces fueron encontradas en el fondo de las magentas utilizadas, lo cual indicaría que las plantas se encontraban muertas para este tiempo. Sin embargo, las plantas crecidas en el tratamiento con 25% mostraron algunas de sus hojas con un ligero cambio de coloración al término de la exposición de las plantas a los tratamientos. Este cambio de coloración fue de un verde esmeralda brillante a un café cobrizo.

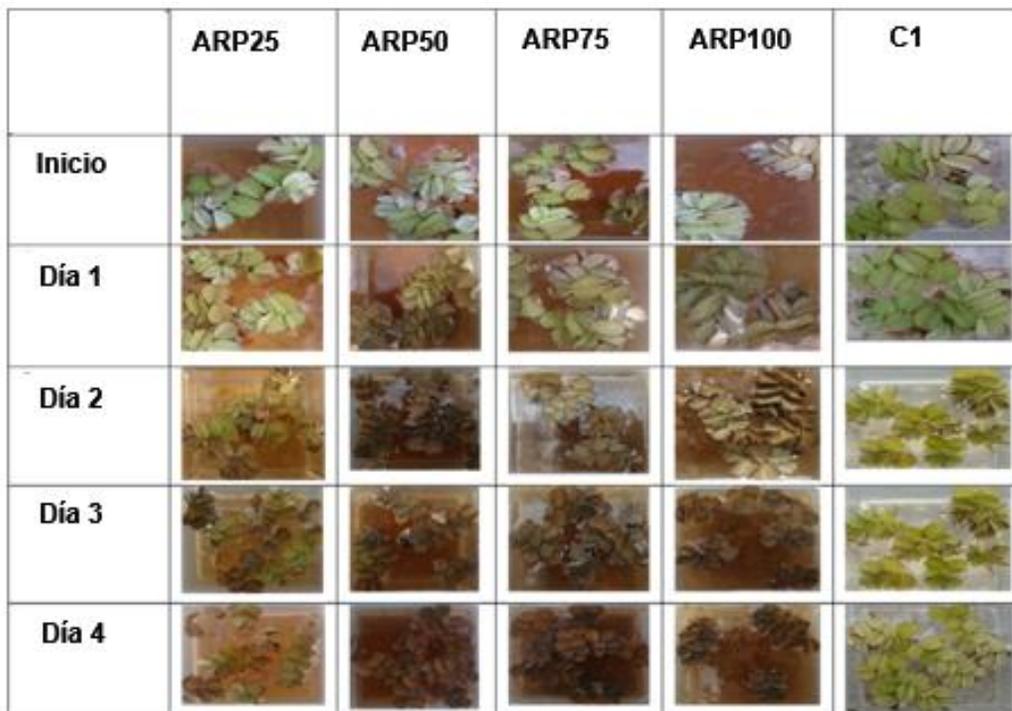


Figura 3.2.4. Exposición de *S. minima* a diferentes porcentajes de agua residual porcina (25, 50, 75 y 100%) y tratamiento control -medio nutritivo de Hoffmann (2004)- durante 4 días

3.2.5- ASPECTO FISICO DE LAS PLANTAS EXPUESTAS A DILUCIONES DE AGUA RESIDUAL PORCINA (DE 10% AL 25%)

En la Fig. 3.2.5 se muestra el aspecto de las plantas expuestas a tratamientos con menor concentración de ARP (10, 15, 20 y 25%) incluyendo dos tratamientos control (agua destilada y solución nutritiva de Hoffman). Se presentaron ligeros cambios de coloración en las plantas expuestas durante un día, el cual se caracterizó por ser de un color verde más oscuro que el verde inicial, con los bordes ligeramente cafés. Hacia el segundo día de exposición de las plantas, no se encontraron cambios de coloración en ningún tratamiento en comparación con el aspecto obtenido en plantas expuestas durante el primer día a los tratamientos. Por otro lado, las plantas control presentaron cambios de coloración en las hojas, lo cual podía deberse a un proceso de envejecimiento de las hojas. Finalmente, hacia el cuarto día de exposición de las plantas, se encontraron

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

cambios de coloración que fue de un verde claro esmeralda a un café cobrizo, el cual se dio mayormente sobre las hojas viejas y en menor frecuencia en hojas nuevas.

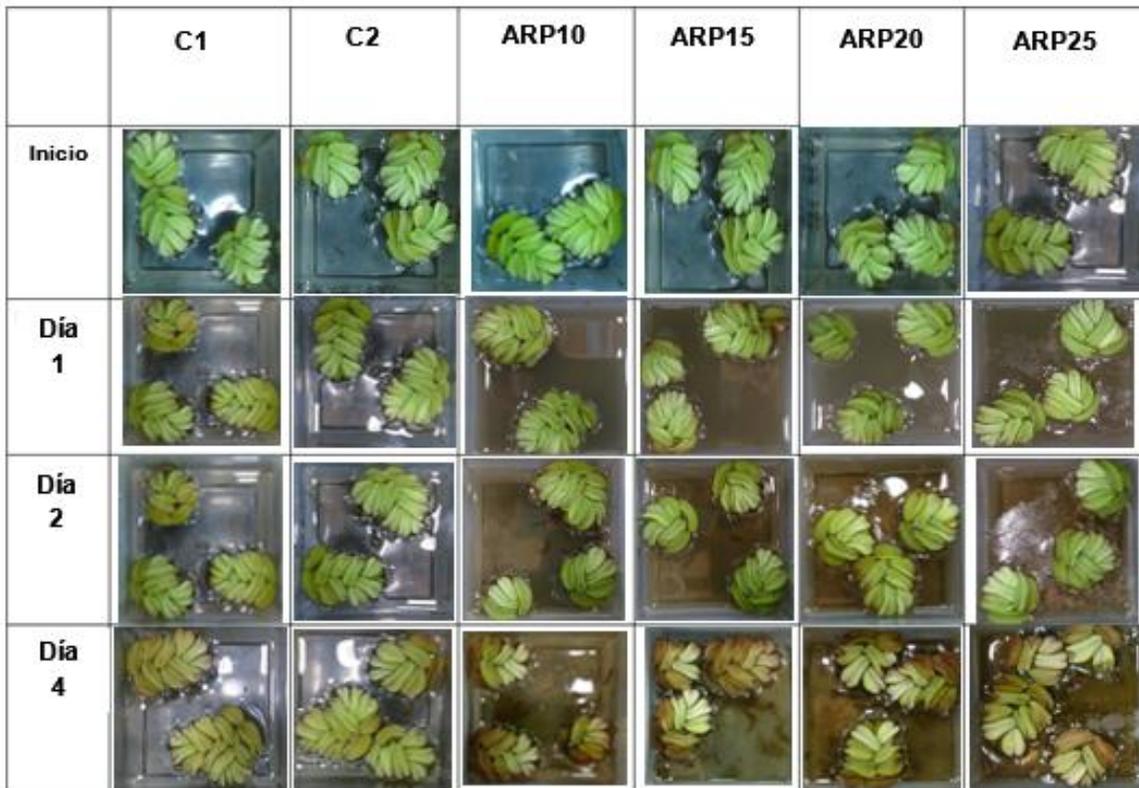


Figura. 3.2.5. Aspecto de plantas de *S. minima* expuestas durante 4 días a diferentes porcentajes de agua residual porcina (10%, 15%, 20% y 25%) y dos tratamientos control: agua destilada y solución nutritiva de Hoffmann (2004).

3.2.6- NÚMERO DE HOJAS

En la Fig. 3.2.6 se observa que el mayor número de hojas fue logrado en las plantas crecidas bajo el tratamiento C2, con 27 hojas, seguido de las plantas crecidas en los tratamientos ARP20 y ARP25, ambos con 25 hojas. El menor número de hojas se registró en plantas sujetas control con agua destilada, con 22 hojas.

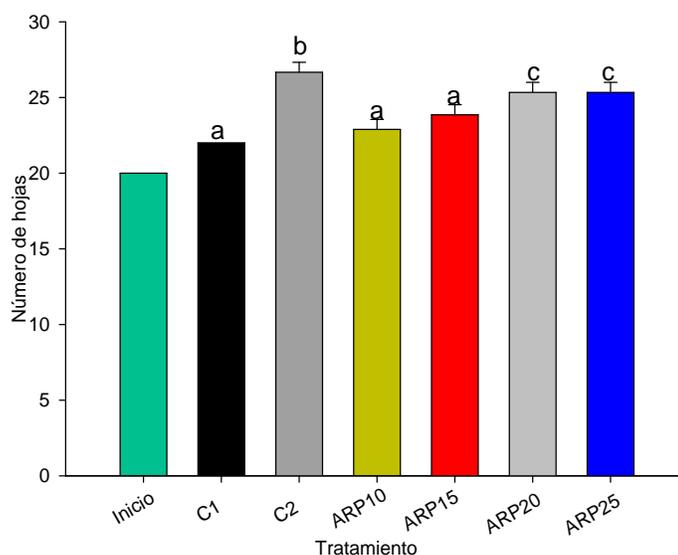


Figura. 3.2.6. Número de hojas en plantas de *S. minima* expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina (10%, 15%, 20% y 25%) durante 4 días. Cada barra representa al promedio de 5 mediciones, y las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.2.7- MORTALIDAD DE HOJAS

En la Fig. 3.2.7 puede apreciarse que la mortalidad de los tratamientos C1 y C2 (5.55% y 2.45%, respectivamente) fue bajo en comparación con la mortalidad obtenida en los tratamientos con ARP (35.25%, 38.00%, y 38.25%), para los tratamientos ARP10, ARP15 y ARP20, respectivamente, mientras que el mayor porcentaje de mortalidad fue encontrado en plantas expuestas al tratamiento ARP 25, con 42.67%.

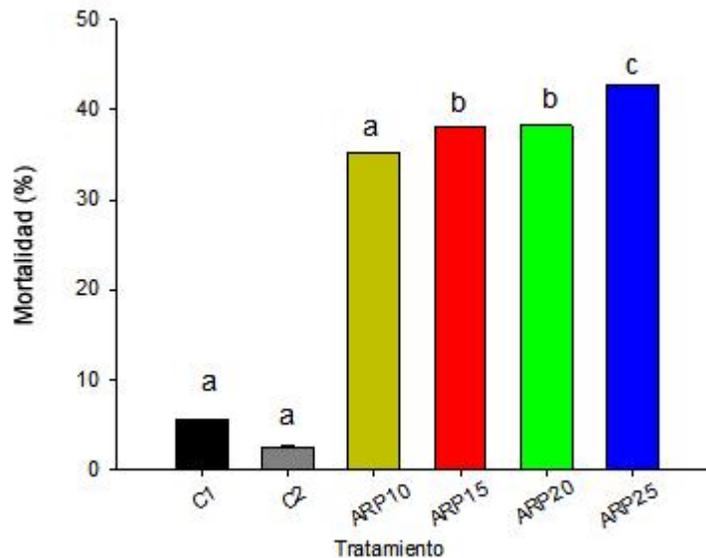


Figura 3.2.7. Tasa de mortalidad de *S. minima* a diferentes porcentajes de agua residual porcina (10%, 15% 20% y 25%) y dos tratamientos control: agua destilada y solución nutritiva de Hoffmann. Cada barra representa al promedio de 5 mediciones, y las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.2.8- LONGITUD DE RAÍCES

En la Fig. 3.2.8 se presenta la longitud de las raíces (en cm) de plantas de *S. minima* expuestas durante 4 días a los tratamientos de agua residual porcina. Se aprecia que las raíces de plantas expuestas a los tratamientos con ARP fueron ligeramente más largas que raíces de plantas expuestas a C1, pero fueron similares en longitud en comparación con raíces de plantas crecidas en C2. No se encontraron diferencias estadísticas en la longitud de las raíces entre los tratamientos con aguas residuales porcinas, pero fueron más largas que las raíces de las plantas en condiciones control.

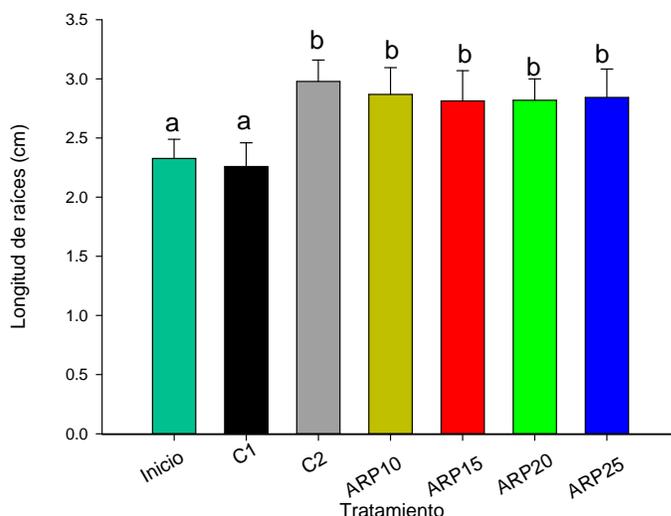


Figura. 3.2.8. Longitud final de raíces de *S. minima* expuesta a diferentes concentraciones de agua residual porcina (10%, 15%, 20% y 25%) durante 4 días. Cada barra representa al promedio de 5 mediciones, y las barras corresponden al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.2.9- BIOMASA DE PLANTAS

Se encontró un aumento de la biomasa de las hojas en todos los tratamientos empleados, (la biomasa al término del experimento fue mayor que la biomasa inicial en un 19.57%, 23.74%, 21.84%, 23.76%, 25.47% y 27.56% para los tratamientos C1, C2, ARP10 ARP15, ARP20 y ARP25, respectivamente) En la Fig. 3.2.9 puede apreciarse que la mayor biomasa foliar se obtuvo en las plantas expuestas al tratamiento ARP25, el cual mostró ser mayor en un 9.93 % con relación a la biomasa de hojas de plantas expuestas a C1. Esta diferencia de biomosas resultó ser estadísticamente significativa. La biomasa obtenida en los tratamientos control C1 y C2 fue similar a la obtenida utilizando menores concentraciones de ARP ($p=0.22$).

En cuanto a la biomasa de raíces, se registró crecimiento de raíces en plantas sujetas a todos los tratamientos (la biomasa final fue mayor en 27.58%, 32.46%, 36.96%, 45.61%, 41.17% y 50.95% en relación a la biomasa inicial para los tratamientos: C1, C2, ARP10, ARP15, ARP20 y ARP25) .Solamente la biomasa de raíces obtenida en plantas expuestas al tratamiento ARP25 mostró diferencias significativas en relación al control, que fue mayor en un 31.93%. No se encontraron diferencias de biomasa de raíces en plantas expuestas a C1 y C2 en comparación con otros tratamientos con menores concentraciones de ARP ($p=0.18$).

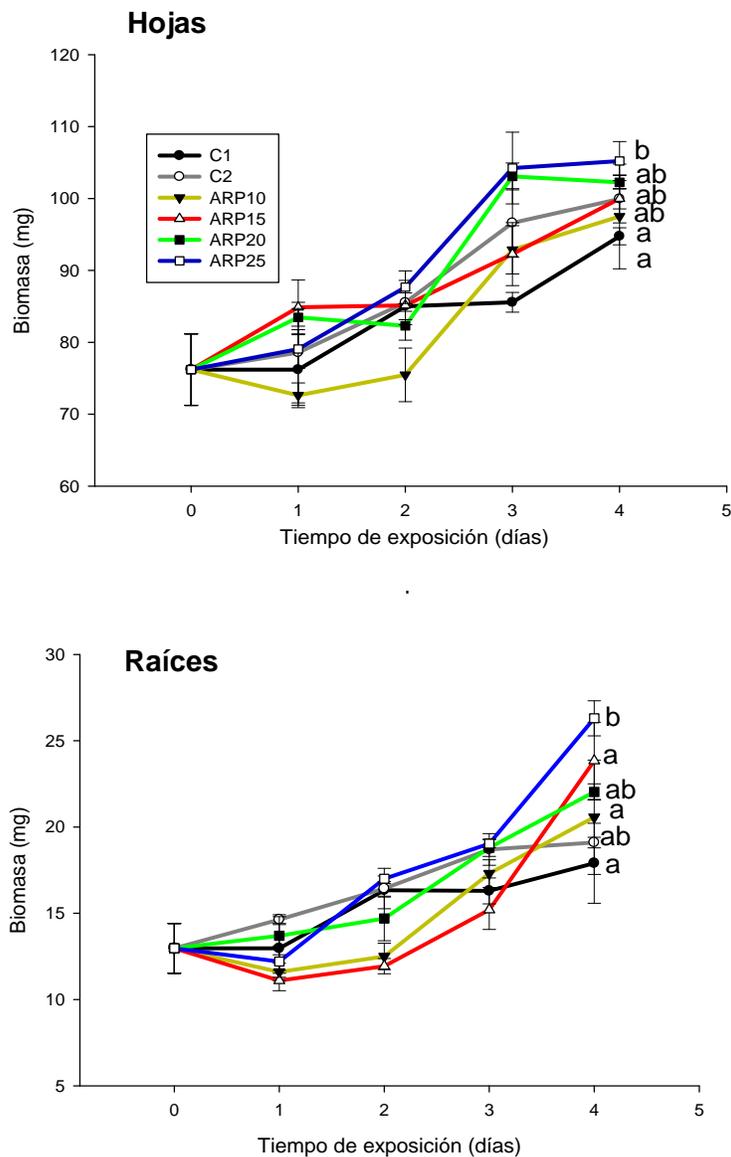


Figura. 3.2.9. Biomasa (peso seco) de hojas de plantas de *S. minima* expuestas a diferentes concentraciones de agua residual porcina (10%, 15%, 20% y 25%) Los puntos graficados representan el promedio de tres réplicas y las barras al error estándar. Las letras diferentes designan diferencias significativas ($p < 0.05$)

3.2.10- TASA DE CRECIMIENTO RELATIVO

Se encontraron diferencias significativas en tasa de crecimiento relativo de las plantas en los tratamientos con agua residual porcina. La mayor tasa de crecimiento relativo fue obtenida en el tratamiento C2 con 0.17 mg/g día, mientras que plantas crecidas en C1 tuvieron la menor tasa de crecimiento relativa, con 0.03 mg/g día. En cuanto a los tratamientos con agua residual, las plantas crecidas en ARP20 y ARP25 presentaron mayores tasa de crecimiento, con 0.13 y 0.15 mg/g día mientras que ARP10 y ARP15 tuvieron una tasa de 0.10 y 0.13 mg/g día (Fig. 3.2.10).

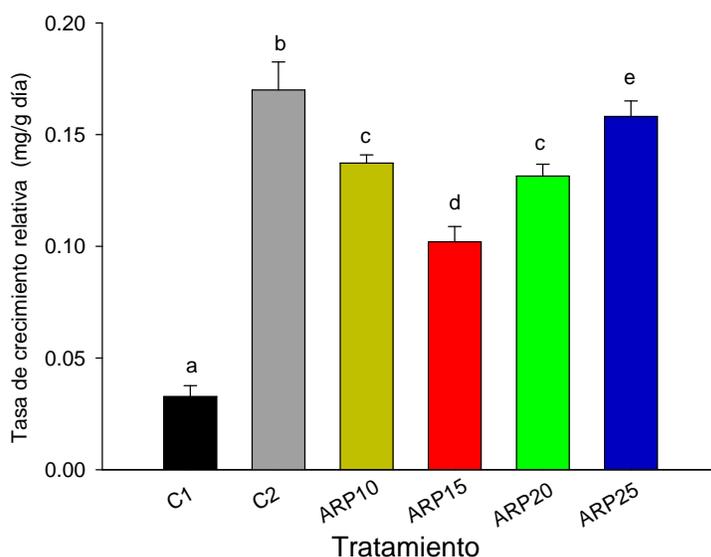


Figura. 3.2.10. Tasa de Crecimiento relativa de *S. minima* en agua residual porcina (del 10 al 25% de su concentración original), durante 4 días de exposición. Las barras indican el error estándar. Las letras designan en donde fueron encontradas diferencias significativas ($p < 0.05$)

3.2.11- FLUORESCENCIA DE CLOROFILA

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en relación al valor de Fv/Fm en las plantas de *S. minima* expuestas a los tratamientos con aguas residuales porcinas diluidas, así como también entre los tiempos de exposición (Fig. 3.2.11). En C1 y C2, el valor de Fv/Fm se mantuvo entre 0.8 y 0.78 a lo largo del tiempo de exposición. Los tratamientos ARP10, ARP15, ARP20 Y ARP25, presentaron un leve descenso en Fv/Fm

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

hacia el cuarto día de exposición, con $F_v/F_m = 0.65$ y 0.63 para los tratamientos de agua residual ARP10 Y ARP15 y $F_v/F_m = 0.70$ y 0.67 para los tratamientos ARP20 Y ARP25, respectivamente.

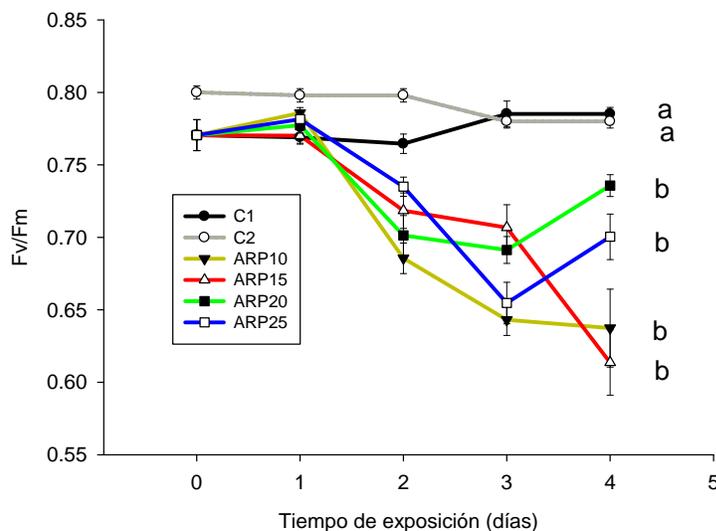


Figura 3.2.11. Fluorescencia de la clorofila (F_v/F_m) de *S. minima* expuesta a diferentes concentraciones de agua residual (10%, 15%, 20% y 25%) y en agua destilada como control durante 4 días. Los puntos graficados corresponden al promedio de 5 repeticiones en 3 réplicas. Las barras indican el error estándar. Las letras designan en donde fueron encontradas diferencias significativas ($p < 0.05$)

3.2.12- FUGA DE ELECTROLITOS

De la Fig. 3.2.12 se observa que el máximo porcentaje de fuga de electrolitos en hojas se obtuvo al primer día de exposición, con 35.22% y 40.22% para los tratamientos control C1 y C2, y 40.4%, 41.9%, 40.62% y 46.36% para los tratamientos con aguas residuales porcinas (de ARP10 a ARP25, respectivamente). Se aprecia una reducción en la fuga de electrolitos en todos los tratamientos hacia el cuarto día de exposición de las plantas, mientras que los tratamientos con mayores concentraciones de ARP (ARP15, ARP20 y ARP25) se mantuvieron por encima de los valores encontrada en C1 y C2.

Al cuarto día de exposición, la fuga de electrolitos para hojas de plantas en tratamientos control fue de 12.81% y 16.18 para C1 y C2, respectivamente, mientras que los tratamientos ARP10 ,ARP15, ARP20 Y ARP25 tuvieron una fuga de electrolitos de 24.10%, 28.83%, 28.63% y 46.53% respectivamente. Estos valores de fuga resultaron ser

de 1.8, 2.25, 2.23 y 3.63 veces superior a la fuga encontrada en hojas de plantas control. (de ARP10 a ARP25).

En cuanto a las raíces, el mayor porcentaje de fuga de electrolitos se obtuvo en plantas expuestas al tratamiento ARP25, seguido de los tratamientos ARP15, ARP20 y en menor proporción, ARP10 (Fig. III-II-11). De mayor a menor, estos porcentajes fueron de 66.66%, 61.48%, 58.10% y 49.36%, mientras que raíces de plantas sujetas a C1 y C2 mostraron valores de de 23.30% y 27.30%, respectivamente. Estos valores resultaron 2.11, 2.63, 2.49 y 2.86 veces más grande que la fuga encontrada en raíces de plantas expuestas al control C1 (de ARP10 a ARP25). .

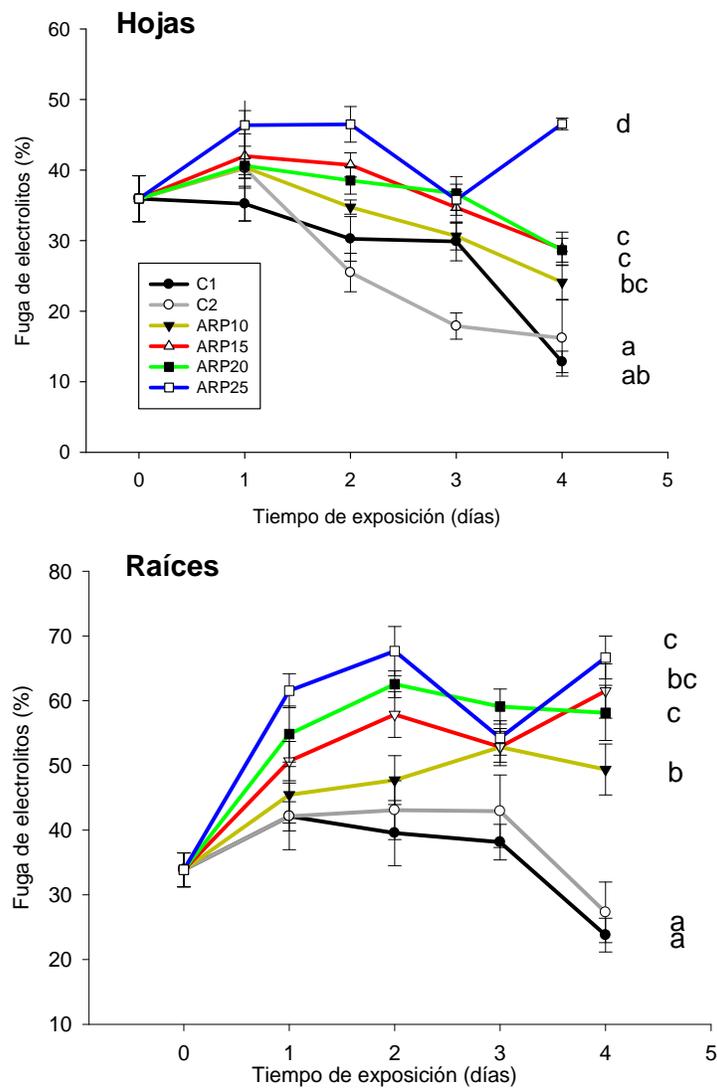


Figura. 3.2.12. Fuga de electrolitos en *S. minima* expuesta a 10%, 15%, 20% y 25% de agua residual porcina.. Las barras indican el error estándar. Las letras designan en donde fueron encontradas diferencias significativas ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN DE LA SECCIÓN 3.2**Caracterización del agua residual**

En el Cuadro 3.2.2 se presenta una comparación de los valores obtenidos en el estudio con valores obtenidos por diversos autores para las variables estudiadas. Los parámetros en la calidad del agua residual porcina generada durante el periodo del 3 al 11 de febrero mostraron algunas fluctuaciones entre los días de muestreo, siendo la conductividad eléctrica, la concentración de nitratos, amonio, Cu y Zn aquellas que mostraron mayor fluctuación entre días de recolecta:

Cuadro 3.2.2. Cuadro comparativo con los valores obtenidos en el agua residual porcina en diversos trabajos con los resultados de aguas residuales porcinas obtenidos en este estudio

Parámetro	Promedio	Valores en la literatura
pH	6.72	5.52 a 7.90 (Lim, 2008); 7.14 a 8.07 (Androvetto, 2003); 7.4 a 7.7 (Michelon <i>et al.</i> , 2016).; 7.3 (Cortés- Esquivel, 2012); 6.89 (Herrmann <i>et al.</i> , 2016)
Conductividad Eléctrica (µS/cm)	6,409	5,230 (Arias- Martínez, <i>et al.</i> , 2010); 2,957 (Fernández <i>et al.</i> , 1996); 4,470.00 (Herrmann, 2016)
Oxígeno disuelto (mg/L)	0.274	0.25 (Arias- Martínez <i>et al.</i> , 2010); 0.4 y 0.5 (Androvetto, 2003);
Nitratos (mg/L)	5.11	44 y 110 (Androvetto, 2003); < 1 (Fernández <i>et al.</i> , 1996); 21 (Herrmann <i>et al.</i> , 2016).
Amonio (mg/L)	6.12	143 (Fernández <i>et al.</i> , 1996); 1,481 (Olguin <i>et al.</i> , 2003); 419.30 (Herrmann <i>et al.</i> , 2016).
Cu disuelto (mg/L)	1.59	0.475 (Arias-Martínez <i>et al.</i> , 2010); 3.1 (Cortés-Esquivel, 2012); 4.7 (Vymazal y Kröpfelová, 2008) 8.3 (Herrmann <i>et al.</i> , 2016).
Zn disuelto (mg/L)	0.59	3.25 (Arias- Martínez <i>et al.</i> , 2010); 54.02 (Cortés-Esquivel, 2012) ;39.0 (Herrmann, 2016)

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

La variación en los parámetros del agua residual porcina pudo deberse a la combinación de diversas causas, como la edad y dieta de los animales, temperatura, método de confinamiento, procedimientos de limpieza, la frecuencia y duración de los lavados, volumen de agua utilizado, cantidad de alimento suministrado y cantidad de alimento desperdiciado (Lim, 2008), aunque, el factor más decisivo sobre la variabilidad de estos parámetros es el volumen del agua utilizado en la limpieza y la dilución del agua residual porcina alcanzada después de este proceso (Chynoweth *et al*, 1999). Dentro del esquema de manejo de la Unidad Porcícola estudiada, existen dos prácticas que posiblemente estén involucradas en esta variabilidad: de acuerdo con los trabajadores de esta granja (comunicación personal), el proceso de limpieza se realiza durante 3 o 4 días consecutivos (tiempo en el que el cárcamo de recolección alcanza el 75% de su capacidad) y posteriormente es vaciado parcialmente hacia a un sistema de tratamiento anaerobio. Por otra parte, los trabajadores de esta unidad omiten los lavados cuando las condiciones climáticas no son favorables, (en días con bajas temperaturas o lluvias) porque se pone en riesgo la salud de los animales por los cambios de temperatura abruptos. Durante el periodo de muestreo, las muestras de agua residual porcina fueron tomadas cuando el cárcamo en donde se recolectaron las muestras había sido vaciado parcialmente o cuando las condiciones ambientales no permitieron el lavado de los corrales. No obstante, la caracterización del agua residual porcina en este trabajo representa el comportamiento en una semana de labores en la granja considerando los procesos de llenado y vaciado del cárcamo, y se confirmó que el agua residual porcina posee un pH casi neutro, un bajo contenido de O₂, alta conductividad eléctrica, la presencia de Cu, Zn, NH₄ y NO₃ y constituye quizás la primera aproximación en la determinación de la calidad del agua residual generada por esta Unidad.

El agua residual porcina se caracteriza por poseer una gran cantidad de materia orgánica e inorgánica, lo cual aumenta la conductividad eléctrica y contribuye a que el contenido de oxígeno sea bajo. Esto se debe a que el exceso de solutos en el agua afecta la solubilidad del oxígeno, y a que la mayoría de las moléculas del agua se encuentra en un estado de solvatación, estableciendo enlaces con otros compuestos. Adicionalmente, otros factores que pueden afectar el contenido de oxígeno disuelto en las aguas residuales porcinas son: el poco o nulo movimiento, la estratificación en el cárcamo de recolección, la temperatura del agua y por último, la actividad biológica de microbios aerobios presentes en el agua residual, los cuales consumen oxígeno para oxidar la materia orgánica (demanda bioquímica de oxígeno).

Por otra parte, el contenido de cobre y zinc en el agua residual porcina fue bajo en comparación con otros estudios realizados con aguas residuales porcinas (Cuadro 3.2.2). Además de las causas de variación mencionadas anteriormente, esto pudo también deberse a que se cuantificó el contenido de estos metales en la fracción líquida del agua residual porcina, ya que esta corresponde la fracción del metal suspendido en la columna de agua que se encuentra disponible para las plantas. Diversos autores (Cestonaro *et al.*, 2014; Cortes- Esquivel, 2012; Suzuki *et al.*, 2010;) reportan que la mayor cantidad de Cu y Zn se encuentran en lodos y sedimentos de aguas residuales porcinas, por lo que muy probablemente el contenido de Cu y Zn en aguas residuales y lodos sea mayor al determinado en el presente trabajo. Para tener una idea más clara y lograr estimar el contenido total de Cu y Zn en desperdicios es conveniente realizar determinaciones en diferentes fases del agua residual porcina, puesto a que este efluente presenta elementos con densidades diferentes, de forma estratificada.

Por último, existen otras formas químicas en las cuales puede presentarse el Cu y Zn en aguas residuales porcinas; 1) ligados a materia orgánica y sulfitos, 2) ligados a Fe y Mg y 3) ligados a carbonatos y bicarbonatos (Cestonaro *et al.*, 2014), las cuales requieren de metodologías diferentes para su cuantificación, y que convendría tomar en cuenta en futuros trabajos con metales pesados en aguas residuales porcinas.

Acumulación de Cu y Zn en *S. minima* ante la exposición a agua residual porcina

Las plantas de *S. minima* expuestas a los tratamientos con aguas residuales porcinas tuvieron una acumulación máxima de 0.31 y 0.77 mg metal/g PS de Cu y Zn, respectivamente, lo cual representa un 71.79% y 72.27% de la concentración inicial de estos metales en el tratamiento ARP25. Esta concentración fue alcanzada al final del tiempo de exposición (4 días), lo que apoya la hipótesis sobre el efecto del tiempo de exposición sobre la concentración final de los metales en los tejidos. Existe evidencia de otras especies útiles en la acumulación de Cu y Zn presentes en aguas residuales porcinas: Fia *et al.* (2014) reportan que *Thypha domingensis* y *Cynodon sp* presentan una capacidad máxima de acumulación de Cu equivalente a 0.013 y 0.0054 mg/g PS, y de 0.133 y 0.067 mg Zn/g PS, encontrando similitudes con nuestro trabajo ya también observamos mayor contenido de Zn que de Cu.

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

En cuanto a los resultados de acumulación de Cu y Zn utilizando menores concentraciones de agua residual porcina, se obtuvo que la concentración final de Cu y Zn en las plantas de *S. minima* no depende del porcentaje de agua residual utilizado. Este es un resultado inesperado, dado a que en el caso de Cu, la mayor acumulación se dio en plantas expuestas al tratamiento ARP10, mientras que la mayor concentración de Zn en los tejidos se dio en plantas expuestas al tratamiento ARP25 y no apoya la hipótesis inicial que enuncia que a mayor concentración de agua residual, mayor sería la acumulación de metales en los tejidos de *S. minima*. Esto pudo deberse a que a pesar de que el tratamiento ARP25 tuvo mayor proporción de agua residual porcina que los demás tratamientos experimentales, el contenido de Cu y Zn en los tratamientos experimentales mostró ligeras variaciones en su contenido, tal como lo mostró la determinación de Cu y Zn inicial en los tratamientos experimentales. Este resultado concuerda por lo encontrado por Mantovi *et al.* (2003), quienes reportan que no existen diferencias en la concentración de Cu en Zn en plantas de maíz, alfalfa y betabel que fueron expuestas a un gradiente de tres concentraciones de agua residual porcina. Los autores reportan que a pesar de encontrar una correlación entre el contenido de Cu y Zn en el suelo con el grado de irrigación, no hubo relación entre el contenido de ambos en el suelo con el contenido en los tejidos vegetales, e indican que este efecto pudo deberse a una disminución en la movilidad de estos elementos dado por el exceso de materia orgánica, ya que el Cu y Zn pueden formar compuestos orgánicos y precipitar, lo que altera la disponibilidad de estos. Se piensa que esto pudo haber ocurrido en los medios experimentales en donde *Salvinia minima* fue expuesta, y fue lo que causó menor disponibilidad de metales en el medio.

Exposición de *S. minima* a los tratamientos ARP25- ARP100

Dentro de los parámetros fisicoquímicos y concentraciones estudiadas en el agua residual, el pH, el contenido de NH_4 y NO_3 y la concentración de Cu y Zn presentaron valores que se encontraron cercanos a los tolerables por esta especie. En cuanto al pH en los tratamientos con ARP del 25% al 100%, este fue en promedio de 6.72 a 7.5, lo cual se ubica dentro del rango considerado como óptimo para el crecimiento de *Salvinia*: 5 a 7.5 (Owens y Smart, 2010), 5.0 a 8.0 (Madsen, 2008) y 6 y 7.5 (Cary y Weerts, 1983) . Cabe mencionar de que el pH encontrado en las soluciones experimentales también coincide con el rango de pH considerado como óptimo para la absorción y asimilación de los micro y macronutrientes- que va de 5.5 a 7.5- (McKenzie, 2003).

Se piensa que el contenido de nitratos y amonios tampoco fue responsable de los efectos encontrados, ya que esta especie es capaz de proliferar en sitios con altas cargas orgánicas, como cuerpos de agua eutrofizados (Acosta- Arce y Agüero- Alvarado, 2006), aguas residuales de cafetalero (Olguín *et al.*, 2003) y aguas residuales porcinas diluidas (Olguín *et al.*, 2007) demostrándose en este último trabajo ser tolerante a concentraciones de hasta 140 mg/L de NH_4 , lo cual se mantiene muy por encima de los niveles de este compuesto en los tratamientos experimentales utilizados en el presente estudio.

Por último, la concentración de Cu y Zn presentes en el agua residual porcina en su concentración original fue de 1.59 mg/L de Cu y 0.59 mg/L, lo cual resultó ser una concentración baja en comparación a las concentraciones probadas en la Sección I en donde se encontró que las plantas sufrieron cambios importantes fisiológicos y de crecimiento que resultaron ser perjudiciales cuando reciben altas concentraciones de Cu y Zn, por lo que diversos factores presentes en el agua residual porcina pudieran estar actuando sobre las plantas.

Dado que el número de publicaciones acerca de los efectos morfológicos y fisiológicos en plantas expuestas en aguas residuales porcinas es limitado, se dificulta la comprensión y comparación de los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, cabe mencionar que uno de los efectos del agua residual porcina vertidos sobre el suelo y agua es elevar el contenido de sales y aumentar la conductividad eléctrica (Frigo *et al.*, 2014) y se ha reportado que esta práctica puede conducir a un estrés salino y provocar diversos estados de sequía fisiológica en las plantas (Herrmann *et al.*, 2016). En el presente estudio, la conductividad eléctrica máxima del tratamiento ARP100 fue de 6,409 S/cm que es ligeramente superior a la conductividad eléctrica promedio del agua de mar (5.3 S/cm; salinidad de 35 g/kg a 25°C), y como es sabido, las plantas responden de manera negativa al exceso de sales porque esto afecta la presión osmótica con que el agua es absorbida (Morales, 2004). Este efecto ha sido reportado por Pérez-Gutiérrez *et al.* (2015), quienes emplearon aguas residuales porcinas (a diferentes concentraciones) para el riego de *Capsicum chinense* y encontraron que aquellos tratamientos con mayores proporciones de aguas residuales porcinas tenían una mayor conductividad eléctrica y provocaron una reducción del potencial hídrico de las hojas, así como un incremento en la conductividad eléctrica del suelo. En el presente estudio, la conductividad eléctrica del agua residual porcina empleada fue 4.5 veces mayor que la que posee el agua residual porcina en el estudio citado, por lo que se piensa que las plantas de *S. minima* estuvieron

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

en condiciones de estrés hídrico, lo cual afectó diversos procesos fisiológicos y que probablemente estos efectos se hayan presentado en mayor magnitud que los encontrados por estos autores.

Dentro de las sales que comúnmente se encuentran en este tipo de efluentes se encuentran diversas formas de fosfatos, sulfato y compuestos con hierro, magnesio, manganeso, potasio, sodio y calcio, (Arias- Martínez *et al.*, 2010) los cuales no fueron determinadas y se piensan que podrían tener un impacto sobre la fisiología de las plantas ya sea por desequilibrio osmótico en las células o por causar estrés iónico por la acumulación de estos elementos en las células. Mediante la realización de estudios más completos en cuanto a los elemento y compuestos presentes en el agua residual porcina, así como a través de mediciones del potencial osmótico del medio experimental y del potencial hídrico de las plantas de *S. minima* se podría abundar más en cuanto a los efectos de este tipo de descargas sobre las plantas, por lo que son necesarios de más estudios en este sentido para tener una respuesta más explicativa del efecto observado.

Por otro lado, el oxígeno disuelto en el agua residual porcina del presente estudio resultó ser muy bajo (de entre 0.27 a 0.33 mg/L). Esta limitante afecta principalmente a los procesos metabólicos aerobios en las células, ya que este elemento actúa como el último aceptor de electrones en la producción de ATP en la respiración celular. La falta de oxígeno es responsable de alteraciones fisiológicas, tales como el desfavorecimiento en el transporte de agua, cambios en sobre la permeabilidad de las raíces y liberación de sales y nutrientes, aumento en el contenido de metabolitos secundarios por la degradación de membranas biológicas (malonaldehído), marchitez de las hojas, baja actividad fotosintética, activación de metabolismo anaerobio, disminución en la disponibilidad de nutrientes por disminución del potencial redox (Cruz- Jiménez, *et al.* 2012) , así como alteraciones en el transporte activo de nutrientes por reducción de la producción de ATP (Jampeetong y Brix, 2009), que en su conjunto impacta de forma integral la fisiología de las plantas y repercuten sobre su crecimiento y desarrollo (Jampeetong y Brix, 2009; Cruz y Monsreal, 2004).

Los efectos del bajo contenido de oxígeno (hipoxia) en las plantas han sido estudiados en otras especies; por citar unos ejemplos; Zaidi *et al.* (2002) probaron genotipos de *Zea mays* y encontraron que estos responden de manera diferente ante el estrés por falta de oxígeno provocado por la inundación y concluyen que el crecimiento,

producción de granos y el número y volumen de las raíces, así como el contenido de clorofila en las hojas se ve afectado en aquellas plantas que fueron inundadas durante 20 días en comparación con plantas control. Por otro lado, Yin *et al.* (2009) estudiaron la respuesta morfológica y fisiológica provocada por inundación y bajo contenido de oxígeno disuelto en plantas de *Crysanthemum x morifolium*, encontrando que las plantas expuestas por 4 días a una condición inundada y bajo contenido de oxígeno presentaron hojas con marchitas, mientras que las hojas viejas presentaron un color blanqueado. y al octavo día de exposición, se registró una mortalidad cercana al 100%. Adicionalmente, estos autores encontraron un aumento en el contenido de malonaldehído, revelando que la hipoxia en plantas también puede producir estrés oxidativo sobre las membranas celulares.

El umbral del estado de hipoxia en plantas es muy variable, y depende en gran medida de la anatomía y de las estructuras de la planta para hacer frente a esta situación; generalmente, se considera que una saturación de oxígeno equivalente al 90% (cerca de 9 y 10 mg O₂/L) es una situación aeróbica adecuada, mientras que la saturación del 30% (entre 5 y 3 mg O₂/L) sería una situación hipoxica y una saturación del 0% (menor a 1 mg O₂/L) indicaría una situación anóxica (Mortimer, 1981). Ante esta situación, muchas especies acuáticas y algunas especies de plantas terrestres que crecen sobre sitios inundables han desarrollado tejido aerenquimatoso, el cual permite la aireación de los órganos sumergidos de las plantas a través del transporte del aire atmosférico por estos conductos, y facilita el intercambio de gases (Evans, 2003).

El género *Salvinia* posee un tipo de aerénquima esquizogénico (aerénquima formado por espacios vacíos entre las células, separadas por una capa de células) que se distribuye de forma radial en torno al estele. Estos espacios llenos de gas le proveen a las plantas la capacidad para flotar en ambientes acuáticos, así como almacenar oxígeno de manera temporal (Jampeetong y Brix, 2009), y permite que sobrevivan en condiciones hipoxicas. Sin embargo, este género presenta poca capacidad para sobrevivir bajo la combinación en medios con altas cargas de contaminantes orgánicos y en condiciones anóxicas, tales como descargas de aguas residuales de actividades agropecuarias (Jampeetong y Brix, 2009), por lo que posiblemente las plantas de *Salvinia minima* expuestas a estas condiciones anóxicas hubieran empleado las reservas de oxígeno en los tejidos, y que al acabarse estas sufrieron de los efectos de la anoxia, lo cual derivó en la muerte de las plantas en un tiempo comprendido entre las 48 y

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

72 horas de exposición a estos tratamientos, sin que hayan tenido la capacidad de sobrellevar esta situación a pesar de poseer un tejido aerenquimatoso bien desarrollado.

Por último, no se descarta que otras variables hayan tenido un papel importante en los efectos observados en las plantas que recibieron los tratamientos con aguas residuales porcinas. Estos factores son muy diversos, y van desde como la presencia de microorganismos (bacterias y hongos), presencia de sales inorgánicas y otros metales pesados, hormonas, antibióticos, entre otros, los cuales no fueron determinados en el presente estudio, y por lo que se necesitaría de más estudios para conocer si algún otro factor pudo haber sido también responsable de la respuesta observada en *S. minima*.

Las diluciones del agua residual porcina (10%, 15%, 20% y 25% del original) mejoraron notablemente la calidad del agua para las plantas; de acuerdo con los resultados de biomasa y no. de hojas al final del tiempo de exposición. Este resultado coincide con lo encontrado previamente en especies tanto terrestres como acuáticas, ya que se ha documentado que el uso de aguas residuales porcinas (en cantidades adecuadas) puede constituir una buena opción de fertilización para fines de riego (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2015; Frigo *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2012). Frigo *et al.* (2014) reporta un aumento del 16% en la biomasa de plantas de *Glycine max* que fueron regadas con diluciones al 75% y 100% de agua residual porcina en comparación de aquellas que recibieron un riego convencional, ya que estas pudieron aprovechar los macro y micronutrientes para su crecimiento. Freitas, *et al.* (2004) encontraron un aumento del 51% en la productividad en peso seco en plantas de maíz que fueron regadas con aguas residuales porcinas, y atribuyen este incremento de biomasa al contenido nutrientes presentes en el agua residual porcina, en comparación con el control (agua corriente).

Por otra parte, el crecimiento de especies acuáticas también ha sido logrado utilizando aguas residuales porcinas: Olguín, *et al.*, (2007) indican que *S. minima* y *Spirodela polyrrhiza* presentaron una tasa de crecimiento relativa superior a la obtenida en plantas crecidas empleando una solución nutritiva, (0.12 mg/ g día en tratamiento control con medio nutritivo de Hutner y 0.16 mg/g día en el agua residual porcina). De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se encontró que las plantas expuestas al tratamiento control con 25% del agua residual porcina poseen una tasa de crecimiento relativo similar al de plantas expuestas al control C2.

El uso del agua residual porcina (en concentraciones controladas) para la producción de plantas acuáticas con aplicaciones biotecnológicas ha sido explorada por diversos autores: Fernández, *et al.*,(1996) reporta que las aguas residuales porcinas constituyen un recurso importante para el crecimiento de plantas de la familia Lemnaceae, las cuales pueden ser aprovechadas para la obtención de proteínas para alimentación de aves de corral. Así mismo, se ha demostrado el crecimiento de *Spirodela polyrrhiza* y *Spirodela oligorrhiza*, ambas con potencial para la obtención de biomasa y remoción de nutrientes (Xu *et al.*,2011) así como una alternativa viable para la obtención de materia prima para la producción de etanol como fuente de combustible, y otros agregados alimenticios como almidón y proteínas (Xu *et al.*, 2012). Sin embargo, existe la posibilidad de la presencia de elementos tóxicos en el agua residual porcina, tales como mercurio, plomo y arsénico (Kong *et al.*, 2003). Cabe mencionar que estos elementos también son bioacumulables en los tejidos de las plantas, y al ser ingeridos existe el riesgo de contaminación alimentaria, por lo que no es recomendable el uso de aguas residuales porcinas para la obtención de insumos alimenticios.

Efectos morfológicos y fisiológicos de *S. minima* en respuesta a la exposición a diluciones del agua residual porcina

Las altas concentraciones de agua residual porcina (tratamientos ARP20 y ARP25) provocaron una mayor mortalidad de las hojas, así como una reducción del valor de Fv/Fm y una mayor fuga de electrolitos tanto para hojas como para raíces. En cuanto al umbral de toxicidad de estos metales sobre las plantas, se sabe que los efectos tóxicos comienzan a partir de una concentración de entre 0.02 y 0.04 mg/g de Cu y 0.2 a 0.3 mg/g de Zn (Krämer y Clemens, 2005), por lo que la concentración de estos metales en los tejidos pudo afectar en alguna magnitud a la planta. (0.31 mg Cu/g PS y 0.77 mg Zn/g PS), y que quizá esta concentración fue bien tolerada por las plantas, pero fueron sensibles a la alta conductividad eléctrica del medio, a la acción o a otro factor que no haya sido determinado. No obstante, la concentración en los tejidos encontrada en este apartado es mínima en comparación con los resultados obtenidos en la Sección 3.1 de este trabajo, en donde se encontraron efectos tóxicos más severos en aquellas plantas que acumularon mayor cantidad de Cu y de Zn, y sugiere que el estrés observado quizá se deba a la suma de diversos factores presentes en el agua residual porcina y no al efecto aislado de la acumulación de Cu y Zn en los tejidos de las plantas.

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

La salud general de *Salvinia minima* ha sido determinada en estudios previos a través de la apariencia general de los individuos en cuanto a su integridad, cambios en su coloración y textura, así como la producción de hojas nuevas (Divakaran *et al.* 1980, Finlayson 1984). La mayor mortalidad de las hojas en plantas expuestas a los tratamientos con diluciones de agua residual porcina al 20 y 25% en parte pudo deberse a un proceso natural de envejecimiento de las hojas (cambio de coloración de verde brillante a verde-olivo) y la aparición de un par de hojas proveniente de los bordes laterales del racimo principal (AIS, 2005). La inhibición y degradación de la clorofila ha sido descrita por Wang *et al.*, 2015 en plantas de *Spirodela polyrrhiza* expuestas a concentraciones altas de aguas residuales porcinas con elevada conductividad eléctrica. Dado a que la determinación de pigmentos fotosintéticos no forma parte de esta tesis, esta suposición necesita ser probada, lo que invitaría al estudio del contenido de los pigmentos fotosintéticos y permitiría aportar más información que permita conocer si existe tal efecto en *S. minima*.

El efecto de los tratamientos con diluciones de agua residual porcina sobre la eficiencia fotosintética de *S. minima* no está claro, dado a que no existe mucha información al respecto. Sin embargo, en el presente estudio, la conductividad eléctrica de los tratamientos ARP20 y ARP25 fue de 1,420 y 1,745 $\mu\text{S}/\text{cm}$, lo cual se encuentra por encima del umbral de tolerancia propuesto por Room y Gill (1985) (1,400 $\mu\text{S}/\text{cm}$) para esta especie, por lo que se sugiere que las diferencias en la eficiencia fotosintética pudieron darse por un desequilibrio osmótico. Los resultados obtenidos de la eficiencia del fotosistema II sugieren que las plantas sufrieron de un estrés osmótico, lo que ocasionó valores de F_v/F_m más bajos que plantas control. Probablemente, la combinación de la degradación de la clorofila y el aumento en la permeabilidad celular provocado por el estrés osmótico (salino) hayan contribuido a esta reducción, lo cual coincide con lo encontrado por Wang *et al.*, (2015) en plantas de *Spirodela polyrrhiza* que fueron expuestas a aguas residuales porcinas y que presentaron reducciones de F_v/F_m y contenido de clorofila. Adicionalmente, se ha descrito que el estrés salino provoca alteraciones sobre la fluorescencia de la clorofila en plantas de *Mangifera indica* (Lucena *et al.*, 2012), así como la sensibilidad de *Salvinia* hacia ambientes moderadamente salinos (Biber, 2009; Jampeetong y Brix, 2009).

Otro de los resultados obtenidos fue el aumento en los valores de F_v/F_m al 4° día de exposición en las plantas expuestas a los tratamientos ARP20 y ARP25, lo cual no fue

observado en los tratamientos de ARP10 y ARP15. Contrario a lo que se pensaba, las plantas bajo los tratamientos con mayor concentración de ARP presentaron menor grado de estrés en comparación con aquellas que fueron expuestas a menores concentraciones de ARP, lo cual pudo deberse a la capacidad de *Salvinia* para modificar la asignación de recursos y crecer aún en las condiciones estresantes. Quizá el aumento en Fv/Fm podría indicar que las plantas podrían estar sobrellevando esta situación y se estarían aclimatando a estas nuevas condiciones, lo cual pudo verse con la producción de nuevas hojas que aparentemente presentaban mayor resistencia a estas condiciones. Por otro lado, la medición de Fv/Fm en las plantas de *S. minima* se realizó tanto en hojas viejas, como en hojas nuevas, esto pudo ser la razón por la cual al momento de ser medidas, presentaron mayores valores de Fv/Fm que las hojas de las plantas progenitoras. Para obtener una respuesta más clara sobre el efecto observado, sería conveniente realizar experimentos en donde se expongan las plantas por tiempo más prolongados para conocer si la recuperación de los valores de Fv/Fm corresponde a la aclimatación de las plantas a estas condiciones. Finalmente, cabe mencionar que las reducciones en Fv/Fm corresponden a un estrés intermedio y que dicha reducción no impidió que las plantas pudieran continuar con su crecimiento.

La exposición a altas concentraciones agua residual porcina (al 20% y 25%) tuvo un efecto significativo sobre la permeabilidad de las membranas celulares, ya que la fuga de electrolitos fue claramente mayor que en plantas control. El mecanismo por el cual el exceso de salinidad afecta a las membranas celulares radica en que el transporte de agua hacia la planta se ve restringido debido a una caída del potencial osmótico por exceso de solutos. (Lucena *et al.*, 2012), así como la liberación de iones importantes en la homeostasis celular, principalmente de K^+ (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Se piensa que esta situación habría provocado cambios en la estructura de las membranas celulares, así como una mayor liberación inicial de electrolitos, y así como daños en los cloroplastos y reducción en la eficiencia del fotosistema II. Los efectos de la salinidad sobre la integridad de las membranas han sido reportados en distintas especies en respuesta a altas conductividades eléctricas, como *Cucumis sativus*, (Khan, *et al.* 2013) *Capsicum annum* (Manivannan *et al.*, 2016), *Abelmoschus sculentus* (Saeed *et al.*, 2014), *Populus x canescens* (Bolu y Polle, 2004) entre otras especies.

En múltiples estudios, se ha resaltado que las raíces son especialmente sensibles a condiciones de salinidad. Esto es debido a que esta parte de la planta se encuentra en

CAPITULO III-RESULTADOS Y DISCUSION

contacto directo con el medio, y las interacciones iónicas entre células y el medio se dan de manera más directa (Munns y Tester, 2008). En el presente estudio, se encontró una tendencia en el aumento de estos valores a medida que el tiempo de exposición fue más prolongado, lo que apoya la hipótesis inicial acerca de que el estrés provocado en las plantas es dependiente del tiempo. Este efecto ha sido reportado anteriormente en otras especies, como *Vigna unguiculata* (Maia, *et al.*, 2010), y *Lycopersicon esculentus* (Bastías *et al.*, 2010).

Por otro lado, se encontró una disminución del porcentaje de fuga de electrolitos en hojas de plantas expuestas a las diluciones experimentales de ARP durante el transcurso de tiempo de exposición, seguido de un aumento en el contenido de electrolitos final en las muestras de hojas de plantas que estuvieron en contacto con las diluciones de agua residual en comparación al encontrado en hojas de plantas control. En condiciones de estrés ambiental, las plantas tienden a producir más materia orgánica, como proteínas y azúcares solubles como una medida para resistir este estrés (Suzuki *et al.* 2014), las cuales poseen una función osmorreguladora (osmolitos), con la finalidad de proteger a las células contra el estrés abiótico producido por condiciones osmóticas desfavorables (Giri, 2011), así como también la protección de las membranas ante el estrés oxidativo (Carrillo, *et al.*, 2011). Esto ha sido encontrado por Khatkar y Kuhad (2000), quienes reportan el aumento en el contenido de prolina (un aminoácido con función osmorreguladora) en plantas de trigo expuestas a altas conductividades eléctricas y Puniram-Hartley *et al.* (2014), quienes encontraron un aumento en el contenido de osmolitos (principalmente sodio) en hojas de trigo y cebada expuestas a salinidad elevada (200 mM de NaCl).

Probablemente las plantas de *S. minima* que recibieron las mayores concentraciones de agua residual en este estudio experimentaron un aumento de osmolitos en sus hojas, lo cual les permitió la tolerancia a la alta conductividad eléctrica de estos medios experimentales. Esto podría explicar el aumento en la biomasa lo cual indicaría que las plantas hayan podido sobrellevar esta situación de estrés

Sin embargo, para conocer si en realidad esto tuvo lugar, se necesita del estudio de osmolitos, tales como el Na, K, glicilbetaína, prolina, manitol, sorbitol y poliaminas, las cuales se ha encontrado que aumentan su concentración en plantas expuestas a estrés osmótico (Giri, 2011). Por último, el crecimiento observado en conjunción con el estrés

puede ser explicado mediante el hecho de que las plantas pueden modificar la asignación de recursos para formar nuevas estructuras en un intento de sobrellevar el estrés ocasionado (Sultan, 2000), y en el caso de *Salvinia*, existen reportes sobre su capacidad para crecer bajo condiciones no favorables mediante el transporte de nutrientes y otros compuestos desde las hojas existentes hasta áreas de crecimiento (Medeiros *et al.*, 2016) así como la transferencia de resistencia a condiciones desfavorables de plantas madres a plantas hijas (Outridge y Hutchinson, 1991) por lo que la aparición de hojas aclimatadas a los tratamientos podría proveer a las plantas la capacidad de desarrollarse en estas diluciones, y continuar con el crecimiento.

CONCLUSIONES DE LA SECCION 3.2

- El agua residual porcina posee cantidades importantes de materia orgánica, con elevada conductividad eléctrica y escaso oxígeno disuelto, La exposición de las plantas durante 3 días al 50% de su concentración provocó necrosis y muerte del tejido, por lo que no se recomienda el uso de esta especie para el tratamiento de este efluente en concentraciones superiores a este porcentaje.
- La dilución del agua residual porcina mejoró la capacidad de las plantas para sobrevivir, encontrándose que *S. minima* fue tolerante hasta un 25% de la concentración original del agua residual porcina.
- Se demostró que *S. minima* es capaz de acumular 0.31 y 0.73 mg metal/PS de Cu y Zn tras la exposición a los tratamientos con aguas residuales porcinas al 25%. Esta concentración equivale al 71.79% y 72.27% de la concentración inicial de estos elementos en el tratamiento con 25% del agua residual porcina, por lo que puede ser considerada como un buen candidato para la remoción de metales a partir de medios orgánicos.
- Contrario a lo que se pensaba, la concentración final de Cu y Zn en los tejidos de las plantas de *Salvinia minima* mostró ser independiente de la concentración de agua residual en los tratamientos. Esto pudo deberse que el contenido de Cu y Zn entre los tratamientos experimentales fue muy similar o a cambios en la disponibilidad de los metales por precipitación orgánica. Así mismo, la acumulación de estos elementos fue mayor a medida que el tiempo de exposición fue más prolongado., encontrándose el máximo potencial de acumulación al final del tiempo de exposición (4 días).
- La exposición de las plantas al tratamiento con el 25% del agua residual porcina actuó como un fertilizante, dado a que se obtuvo la mayor tasa de crecimiento se obtuvo en plantas expuestas a este tratamiento y fue muy similar a la obtenida en el control con solución nutritiva de Hoffmann. Esto pudo presentarse a que este tratamiento poseía la mayor concentración de amonio y nitratos, -entre otros compuestos- de todos los tratamientos experimentales.

- La exposición de las plantas a los tratamientos con agua residual provocó un aumento en la mortalidad de las hojas, lo cual pudo deberse a la combinación de factores presentes en el agua residual porcina. En base a los resultados obtenidos, se sospecha la elevada conductividad eléctrica del medio pudo haber tenido un papel importante sobre este proceso, dado a que muchos de los resultados obtenidos corresponden al estrés ocasionado por condiciones osmóticas e iónicas desfavorables, aunque no se descarta la participación de otras variables que no fueron incluidas en el presente estudio.
- Las plantas de *S. minima* presentaron cambios en la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) cuando fueron expuestas al agua residual porcina en concentraciones de 10% a 25%, lo cual pudo deberse a la interacción de diversas condiciones estresantes, como son la conductividad eléctrica, bajo oxígeno disuelto en el medio, así como la participación de otros factores que no fueron determinados. Así mismo, se observó una tendencia hacia el restablecimiento de Fv/Fm en los tratamientos con ARP20 y ARP25, y a pesar que con la información disponible no puede saberse la razón de este fenómeno, este resultado podría indicar que las plantas estarían adaptándose a estas condiciones. Además, esta variable mostró ser sensible ante la exposición de las plantas a los tratamientos con agua residual porcina, lo cual podría ser empleada como un buen indicador de estrés producido en plantas empleadas en tratamientos para fines de fitorremediación de estos efluentes.
- Se encontró un mayor porcentaje de fuga de electrolitos en plantas expuestas a los tratamientos con mayores concentraciones de agua residual porcina, la cual se observó tanto en hojas como en raíces. En el caso de las hojas, el descenso de estos valores de fuga podrían indicar que las planta estarían respondiendo de alguna manera un proceso de osmorregulación mediante la producción y almacenamiento de osmolitos
- En comparación con los resultados obtenidos en la Sección I, la acumulación de Cu y Zn fue baja en plantas expuestas a los tratamientos con aguas residuales

CAPITULO III- RESULTADOS Y DISCUSION

porcinas., por lo que los efectos fisiológicos encontrados en este trabajo pudieron deberse a otras variables y no directamente al estrés ocasionado propiamente por un exceso de Cu y Zn

CONCLUSIONES GENERALES

- *Salvinia minima* posee una interesante capacidad para acumular y tolerar cantidades importantes de Cu y Zn, por lo que se considera como una especie con un potencial para ser usado en futuras aplicaciones de fitorremediación.
- A pesar de que el Cu y Zn son elementos indispensables para las plantas, en concentraciones relativamente pueden causar alteraciones sobre la eficiencia cuántica máxima e integridad de las membranas, lo cual repercute directamente sobre el crecimiento y desarrollo de las mismas.
- La toxicidad por exceso de Cu en *S. minima* fue más severa que la toxicidad provocada por exceso de Zn. Esto se concluye a partir del aspecto físico, eficiencia fotosintética y fuga de electrolitos de las plantas, los cuales mostraron mayor alteración en plantas expuestas a 80 μM de CuSO_4 que en plantas expuestas a 80 μM de ZnSO_4 .
- Mediante la realización de este trabajo fue posible obtener información sobre la tolerancia, efectos y eficiencia de esta especie para la remoción de Cu y Zn con dosis experimentales y con diluciones de agua residual porcina en condiciones semi- controladas bajo condiciones climatológicas propias de la Península de Yucatán. Así mismo, se incluyen algunos aspectos metodológicos que podrían ser útiles en futuros esfuerzos de fitorremediación acuática con esta especie.
- El tratamiento de las aguas residuales porcinas en nuestra región debe ser abordado desde múltiples puntos de vista. La incorporación de sistemas con plantas acuáticas a las ya existentes plantas de tratamiento podría elevar el rendimiento de estos sistemas en cuanto a la remoción de contaminantes inorgánicos, por lo que resulta necesario estudiar estos sistemas.

PERSPECTIVAS

- Este trabajo fue realizado bajo condiciones de invernadero, con la finalidad de recrear de una mejor manera un proceso de fitorremediación en campo. La información obtenida en la fase experimental de este trabajo fue obtenida durante los meses de junio a agosto, que fueron meses calurosos. Para tener una idea más clara sobre un proceso de fitorremediación en nuestra región, convendría realizar estudios de acumulación y evaluaciones del estrés producido en diferentes estaciones y comparar si existe o no alguna época del año en la que el proceso de fitorremediación sea más satisfactorio.
- Se encontró que las plantas de *S. minima* acumularon mayor cantidad de Zn que de Cu a bajo la misma concentración, sin embargo con la información obtenida se pudiera pensar que se debe a que el efecto inicial del Cu al ser más severo que el Zn, pone en desventaja a estas plantas por lo que la toma del elemento está relacionada con el estado general de la planta. A través de experimentos en donde ambos metales estuvieran presentes podrían relevar información más completa acerca de si existe o no preferencia, competencia o inhibición en la toma de metales por parte de esta especie.
- Durante la realización de la maestría, se realizaron actividades que no fueron incluidas en la presente tesis como curvas de luz y de CO₂ y la toma de imágenes térmicas de plantas expuestas a los tratamientos descritos. La realización de la primera actividad mencionada permitiría elucidar de manera más precisa los efectos de la acumulación de estos metales sobre la respuesta fotosintética bajo condiciones no limitantes, mientras que la segunda actividad permitiría identificar si existe alguna forma de emplear imágenes térmicas como indicadores de daño producido por estrés por metales pesados.
- La caracterización del agua residual porcina producida por la Unidad Porcícola del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias realizada en este estudio representa uno de los pocos estudios sobre la calidad del agua que se realizan en este sitio. Además, la determinación de Cu y Zn permitieron establecer la presencia de estos elementos en este efluente, lo cual no se había sido realizado anteriormente. Se propone realizar un monitoreo de la calidad del durante una

PERSPECTIVAS

escala de tiempo más prolongada, con el fin de conocer el comportamiento de este sistema, así como conocer si existen fluctuaciones estacionales, así como conocer el contenido de metales en diferentes fases del agua residual porcina.

- Dado a que el agua residual porcina se trata de un efluente heterogéneo, es difícil señalar una sola causa al efecto observado sobre la fisiología de las plantas; Se requiere de más estudios cuyo enfoque sea aislar las posibles causas de variación en ambientes semi-controlados; tales como gradientes de conductividad eléctrica (salinidad), oxígeno disuelto, contenido de nutrientes, entre otros. Se propone realizar pruebas fisiológicas que resulten ser complementarias a las realizadas en este trabajo, tales como peroxidación lipídica, contenido de clorofilas, concentración de osmolitos (prolina), respuesta antioxidante y curvas de fotosíntesis bajo condiciones no limitantes, lo cual proveería más información y permitiría elucidar más efectos causados por la exposición al agua residual porcina.
- Finalmente, sería interesante conocer el desempeño de otras especies acuáticas de distribución regional en un intento de reconocer especies tolerantes que puedan ser aplicables a futuros esfuerzos de fitorremediación. Se sugiere continuar con el estudio de la fisiología y capacidad de acumulación de metales en este tipo de efluentes, como medida para hacer recomendaciones técnicas en la instalación de humedales artificiales.

BIBLIOGRAFIA

- Acosta-Arce, L., Agüero –Alvarado, R. 2006. Malezas acuáticas como componentes del ecosistema. *Agronomía Mesoamericana*. 17: 213-218.
- Agami, M., Reddy, K. R. 1989. Inter-relationships between *Salvinia rotundifolia* and *Spirodela polyrrhiza* at various interaction stages. *Journal of Aquatic Plant Management*. 27:96-102.
- Aisien, F. A., Faleye, O., Aisien, E. T. 2010. Phytoremediation of heavy metals in aqueous solutions. *Leonardo Journal of Sciences* 17. 37-46.
- Androvetto- Villalobos, E. 2003. Diseño y operación de un modelo para el tratamiento de las aguas residuales provenientes de la granja porcina de la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de Maestría. Escuela Regional de Ingeniería Sanitaria y Recursos Hidráulicos. (ERIS). Guatemala.
- Al-Hamdani, S. H., Blair, S. L. 2004. Influence of copper on selected physiological responses in *Salvinia minima* and its potential use in copper remediation. *American Fern Journal* 94 47– 56
- Aquatic Invasive Species (AIS). 2005. Giant Salvinia [Online] (Actualizado en junio, 2005) Disponible en: http://www.in.gov/dnr/files/GIANT_SALVINIA.pdf
[Acceso 11 febrero 2016].
- Arias Martínez, S. A., Betancur Toro, F.M., Gómez Rojas, G., Salazar Giraldo, J.P., Hernández Ángel, M.L. 2010. Fitorremediación con humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales porcinas. *Informador Técnico (Colombia)* . 74:12-22.
- Azevedo, De, J. P. A., Peixoto-Henares, M. N. Biomass reduction of *Salvinia molesta* exposed to copper sulfate pentahydrate. *Ambiente & Agua- An Interdisciplinary Journal of Applied Sciences*. 10: 520-529.
- Balsberg-Påhlsson, A. M. 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. A literature review. *Water, Air and Soil Pollution*. 47:288-318

BIBLIOGRAFIA

- Bastías, E., Alcaraz- López, C., Bonilla, I., Martínez-Ballesta, M. C., Bolaños, L., Carvajal, M. 2010. Interactions between salinity and boron toxicity in tomato plants involve apoplastic calcium. *Journal of Plant Physiology* 167: 54-60.
- Baszynsk, T., Tukendorf, A., Ruszkowska, M., Skorzynska, E., Maksymiec, W. 1988. Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non tolerant spinach exposed to excess copper. *Journal of plant physiology*. 132: 708-713.
- Barman S.C., Sahu R. K, Bhargava S. K, Chaterjee C 2000. Distribution of heavy metals in wheat, mustard, and weed grown in field irrigated with industrial effluents. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 64:489–496.
- Baron, M., Arellano, B., López-Gorgé, J. 1995. Copper and photosystem II: A controversial relationship. *Physiologia Plantarum*. 94. 174–180.
- Bazihizina, N., Taiti, C., Marti, L. Rodrigo-Moreno, A., Spinelli, F., Giordano, C., Caparotta, C., Gori, M., Azzarello, E., Mancuso, S. 2014. Zn⁺²- induced changes at the root level account for the increased tolerance of acclimated tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*. 17: 4931-42 .
- Bettger, W.J. 1989. The effect of dietary zinc deficiency on erythrocyte-free and membrane-bound amino acids in the rat. *Nutrition research*. 9: 911- 919.
- Biber, D. P. 2009. Determining salinity-tolerance of giant *Salvinia* using chlorophyll fluorescence. *Gulf and Caribbean Reseach*. 21 1-6.
- Bikker, P., Jongbloed, A. W., Verheijen, R., Binnendijk, G., van Diepen, H., 2011. Zinc requirements of weaned piglets. *Livestock Research Publisher*. 830. 3-39.
- Bizzo, A. L. T., Chaves, A. I, Gomes, P. H., Satika- Suzuki, M., Dos-Santos - Estévez Short- term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. *Acta Limnologica Brasiliensia*. 26:268-277.
- Bolu, W. H., Polle, A. 2004. Growth and stress reactions in roots and shoots of a salt-sensitive poplar species (*Populus x canescens*). *Tropical Ecology*. 45:161-171.
- Brink, M. F., Becker, D. E., Terril, S. W., Jensen, A. H. 1959. Zinc toxicity in the weaning pig. *Journal of Animal Science*. 18: 836 – 842 .

BIBLIOGRAFIA

- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., Zhao, F. 2009 . Function of nutrients: Micronutrients. En: Marschner, P. 2009. Marschner´s Mineral Nutrition of Higher Plants. 3^{era} Ed. Elsevier Academic Press. Estados Unidos de América, 192-248.
- Buta, E., Török, A., Csog, Á, Zongo, B., Cantor, M., Buta, M., Majdik, C. 2014. Comparative studies of the phytoextraction capacity of five aquatic plants in heavy metal contaminated water. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 42 173-179
- Carrillo, P, Grazia-Annunziata, M., Pontecorvo, G., Fuggi, A., Woodrow, P. 2011. Salinity Stress and Salt Tolerance. *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*,.Shanker (Ed.), InTech, [Online]
- Disponible en : <http://www.intechopen.com/books/abioticstress-in-plants-mechanisms-and-adaptations/salinity-stress-and-salt-tolerance>
- [Acceso 13 de enero 2017]
- Cary, P. R., Weerts, P. G. J. 1983. Growth of *Salvinia molesta* as affected by water temperature and nutrition. Effects of phosphorus level. *Aquatic Botany*.17 :61-70
- Chanu, L. B., Gupta, A. 2016. Toxicity of zinc on growth of an aquatic macrophyte, *Ipomea aquatica* Forsk. *Current World Environment*. 11: 218-227.
- Caspi, V., Droppa, M., Hovárth, G., Malkin, S., Marder, J. B., Raskin, V.I. 1999. The effect of copper on chloroplast organization during greening of barley leaves. *Photosynthesis Research* 62. 165-174
- Cestonaro, A A., Kunz, A., Radis- Steinmetz, R. L., Justi, K. C. 2014. Zinc and copper distribution in swine wastewater treated by anaerobic digestion. *Journal of Environmental Management*. 141: 132-137.
- Chynoweth, D.P., Wilkie, A. C., Owens, J. M. 1999. Anaerobic Treatment of Piggery Slurry. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 12: 607-628.
- Colangelo, E. P., Guerinot, M. L. 2006. Put the metal in the petal : metal uptake and transport throughout plants. *Current Option in Plant Biology*. 9. 322- 330

BIBLIOGRAFIA

- Cook, C. M., Kostidou, A., Vardaka, F., Lanaras, T. 1997. Effects of copper on the growth, photosynthesis and nutrient concentrations of *Phaseolus* plants. *Photosynthetica* 34: 179-193.
- Cortes- Esquivel, J. A., Giacomán- Vallejos, G., Barceló- Quintal, I.D., Méndez-Novelo, R., Ponce-Caballero, M. C. 2012. Heavy Metals Removal from Swine Wastewater Using Constructed Wetlands with Horizontal Sub-Surface Flow. *Journal of Environmental Protection*. 3: 871-877.
- Cruz Santos, G., Monsreal G, L. 2004. Efecto de la oxigenación en la capacidad de *Salvinia minima* Baker para crecer y remover metales pesados de medios acuosos. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida Yucatán México.
- Das, S., Goswami, S. 2016. Copper phytoextraction by *Salvinia cucullata*: biochemical and morphological study. *Environmental Science and Pollution Research*. 3:116-124
- Dhir, B. (2013). *Phytoremediation: Role of Aquatic Plants in Environmental Clean Up*. Nueva Delhi: Springer- India. 109 pp.
- Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P.P. 2008. Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20: 61-70
- Dhir, B., Srivastava, S. 2011. Heavy metal removal from multi-metal solution and wastewater by *Salvinia natans*. *Ecological Engineering*. 37: 893- 896
- Divakaran, O., M. Arunachalam, and N. Balakrishnan. 1980. Growth rates of *Salvinia molesta* with special reference to salinity. *Proceedings of the Indian Academy of Science (Plant Science)* 89:161-168.
- Drucker, A. G., Escalante- Semerena, R. E., Gómez - González, V., & Magaña-Rueda, S. 2004. La Industria Porcina en Yucatán: Un análisis de la generación de aguas residuales. *Problemas del Desarrollo: Revista Latinoamericana de Economía*. 34: 106-124.
- Egea, I., Bian, W., Barsan, C., Jauneau, A., Pech, J. C., Latché, A., Li, Z., Chervin, C. 2011. Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit. *Spectral confocal*

BIBLIOGRAFIA

- microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse recording on intact live tissue. *Annals of Botany* 108. 291-297.
- Escalante- Estrada, V., Garzón-Zúñiga, M. A. 2011. Opciones de tratamiento para aguas residuales de tres granjas porcícolas. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*. 2: 87-90
- Evans, D. E. 2003. Aerenchyma formation. *New Phytologist*. 161: 35-49.
- Fernandes, J. C., Henriques, F. S. 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical review*. 57: 246-273.
- Fernández, J. F., Novoa, M. del C., Cervantes, A. 1996. Tratamiento de residuales porcinos y domésticos mediante el cultivo de Lemnaceae. Centro de Hidrología y Calidad del Agua. Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos. La Habana, Cuba.
- Fia, R., Vilas-Boa, R., Campos, A., Fia, F., De Souza, E. 2014. Removal of nitrogen, phosphorus, copper and zinc from swine breeding waste water by Bermudagrass and cattail in constructed wetland systems. *Engenharia Agrícola Jaboticabal*. 34:112-123.
- Finlayson, C. 1984. Growth rates of *Salvinia molesta* in Lake Moond-arra, Mount Isa, Australia. *Aquatic Botany* 18:257-262.
- Freitas, W. S., Oliveria, R. A., Pinto, F. A., Cecon, P. R., Galvão, C. C. 2004. Effect of swine wastewater application on corn production for silage. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 8:120- 125.
- Frigo, E. P., Sampaio, S. C. Ferreira da Silva, A. A., de Andrade, M. G., Koglin- Bastos, R., Ferreira- Santos, R. 2014. Cultivation of soybean with swine wastewater. *African Journal of Biotechnology*. 13: 423- 429.
- Fuentes, I.I., Espadas – Gil, F., Talavera – May, C., Fuentes, G., Santamaría, J. M. 2014. Capacity of the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker) to accumulate high concentrations of nickel in its tissues, and its effects on plant physiological processes. *Aquatic Toxicology* .155. 142-150.
- Garg, N., Kaur, H. 2012. Response of antioxidant enzymes, phytochelatins and glutathione production towards Cd and Zn stresses in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Genotypes

BIBLIOGRAFIA

- colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Agronomy and Crop Science*.199. 118-133.
- Garzón M. y Buelna G. 2014. Caracterización de aguas residuales porcinas y su tratamiento por diferentes procesos en México. *Revista Internacional de Contaminación. Ambiental*. 30: 65-79
- Giri, J. 2011. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Physiology & Behavior*. 6:1: 1746–1751.
- Grotz, N., Guerinot, M. L. 2006. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 595-608.
- Guerinot, M. L. 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1464: 190-198.
- Guimaraes, F. P., Aguiar, R., Oliveira, J. A., Silva, J. A. A., Karam, D. 2012. Potential of macrophyte for removing arsenic from aqueous solution. *Planta Daninha*. 30: 683-696
- Hammad, D. M. 2011. Cu, Ni and Zn phytoremediation and translocation by Water Hyacinth plant at different aquatic environments. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 5: 11-22
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., 2013. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt induced damages. En: Ahmad, P., Azooz, M.M. Prasad, M.N.V. 2013. *Ecophysiology and responses of plants under salt stress XVI*. Springer New York. Estados Unidos de América. 25-87
- Herbario CICY. (2016). Flora de la Península de Yucatán. [Online]
- Disponibile en <http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/>
- [Acceso 12 de febrero 2016]
- Herrmann, D. D., Samapio, S. C., Castaldelli, A. P., Tsutsumi, C., Prior, M. 2016. Association of swine wastewater and mineral fertilization on black oat production. *Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering*. 36:799-810.

BIBLIOGRAFIA

- Hoffmann, T., Kutter, C., Santamaría, J. M. 2004. Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. *Engineering in Life Sciences*.4: 61- 65.
- Holtra, A., Zamorska-Wojdyla, D. 2014. Bioaccumulation capacities of copper (II) ions in *Salvinia natans*. *Environment Protection Engineering*. 40. 41-51.
- Iha, D.S. & Bianchini-Junior, I., 2015. Phytoremediation of Cd Ni Pb and Zn by *Salvinia minima*. *International Journal of Phytoremediation*, 17: 929–935.
- Jacela, J., DeRouchey, J. M., Tokach, M. D., Goodband, R. D., Nelseen, J. L., Reter, J. G., Dritz, S. S. 2010. Feed additives for swine : Fact sheets- high dietary levels of copper and zinc for young pigs, and phytase. *Journal of Swine Health and Production*.18: 87-91.
- Jampeetong, A., Brix, H. 2009. Effects of NaCl salinity on growth, morphology, photosynthesis and proline accumulation of *Salvinia natans*. *Aquatic Botany*. 91:181- 186
- Kaya, C., Tuna, A. L., Sonmez, O., Ince, F., Higgs, D. 2009. Mitigation effects of Si in maize plants grown at high Zn. *Journal of Plant Nutrition*. 32: 1788-1798.
- Khan, M.M., Al-Masóudi, R, Al-Said, F., Khan, I. 2013. Salinity effects on growth, electrolyte leakage, chlorophyll content and lipid peroxidation in cucumber (*Cucumis sativus* L). 2013 International Conference on Food and Agricultural Sciences. 55: 28-32.
- Khatkar, D., Kuhad, M.S. 2000. Short term salinity induced changes in two wheat cultivars at different growth rates. *Biologia Plantarum* 43 :629-632
- Kirkby, E. A., Römheld, V. 2007. Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility. *Proceedings* 543.1- 51.
- Kong, X. H., Lin, W.W., Wang, B. Q. (2003). Study on vetiver's purification for wastewater from pig farm. *Proceedings of the 3rd International Conference on Vetiver and Exhibition*. Guangzhou, China.
- Krämer, U., Clemens, S. 2005. Functions and homeostasis of zinc, copper and nickel in plants. En: *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. 2005. Springer- Alemania. 216-271

BIBLIOGRAFIA

- Küpper, H., Andresen, E. 2016. Mechanism of metal toxicity in plants. *Metallomics* 8: 269-285.
- Lansing S., Viquez J., Martínez H. y Botero R. 2008. Quantifying electricity generation and waste transformation in a low cost, plug flow anaerobic digestion system. *Ecological Engineering*. 34: 322- 348.
- Leal-Alvarado, D.A., Espadas y Gil, F., Sáenz-Carbonell, L., Talavera-May, C., Santamaría, J. M., 2016. Lead accumulation reduces photosynthesis in the lead hyper-accumulator *Salvinia minima* Baker by affecting the cell membrane and inducing stomatal closure. *Aquatic Toxicology* 171. 37-47 .
- Lee, R. C., Nacht, S., Lukens, J. N., Cartwright, G. E. 1968. Iron metabolism in copper-deficient swine. *The Journal of Clinical Investigation*. 47: 2058- 2069.
- Lim, S. J. 2008. Swine wastewater treatment by the static granular bed reactor. Tesis de Maestría- Iowa State University.
- Liu , J., Xiong, Z., He Huang, L. 2004. Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from Cu contaminated and non-contaminated sites. *Environmental and Experimental Botany* 52. 43-51 .
- Lucena, C. C., De Siqueira, D.L., Prieto-Martínez, H. E., Cecon, P. R. 2012. Salt stress change chlorophyll fluorescence in mango. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 34. 4. 1245-1255.
- Madsen, J. D., Wersal, R. M. 2008. Growth regulation of *Salvinia molesta* by pH and available water column nutrients. *Journal of Freshwater Ecology*.. 2.305-312.
- Maia, J. M., Voigt, E. L., Macedo, C., E. C., Ferreira- Silva, S. L., Silveira, J. A. G. 2010. Salt induced changes in antioxidative enzyme activities in roots tissues do not account for the differential salt tolerance in two cowpea cultivars. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 22 :113. 122.
- Manivannan, A., Soundararajan, P., Muneer, S., Ho-Ko, C., Ryong, B.J. 2016. Silicon mitigates salinity stress by regulating the physiology, antioxidant enzyme activities and protein expression in *Capsicum annum* 'Bugwang'. *BioMed Research International* 2016. 2-13.

BIBLIOGRAFIA

- Mantovi, P., Bonazzi, G., Maestri, E., Marmioli, N. 2003. Accumulation of copper and zinc from liquid manure in agricultural soils and crop plants. *Plant and Soil*. 250. 249-257.
- Mateos-Naranjo, E., Redondo- Gómez, S., Cambrollé, J., Figueroa, E. 2008. Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Marine Environmental Research* 66. 459-465 .
- McKone, T. E., Maddalena, R. L. 2007. Plant Uptake of organic pollutants from soil: A critical review of bioconcentration estimates based on models and experiments. US Environmental Protection Agency. National Exposure Research Laboratory. Department of Energy. E. U. A.
- Medeiros, J. C. C., Coelho, F. F., Texeira. E. 2016. Biomass allocation and nutrients balance related to the concentration of N and P in *Salvinia auriculata* (Salvinaceae). *Brazilian Journal of Biology*. Vol. 76. No. 2. 461-468 pp. ISSN 1519-6984
- Mena J., Rodríguez L., Núñez J., Villaseñor J. 2008. Depuración de aguas residuales con humedales artificiales. : Ventajas de los sistemas híbridos. Congreso Nacional del Medio Ambiente. Madrid, España.
- Méndez-Novelo, R. Castillo-Borges, E., Vázquez-Borges, E., Briceño-Pérez, O., Coronado-Peraza, V., Pat-Canul, R., Garrido Vivas, P. 2009. Estimación del potencial contaminante de las granjas porcinas y avícolas del estado de Yucatán. *Ingeniería, Revista de la FI-UADY*. 13: 13- 21
- Michel- López, C. Y., Espadas-Gil, F., Fuentes, G., Santamaría, J.M., González-Mendoza, D. 2016. Bioaccumulation and changes in the photosynthetic apparatus of *Prosopis juliflora* exposed to copper. *Botanical Sciences* 94 (2). 323-330 pp.
- Michelon, W., Da Silva., M. L., Mezzari, M. P., Pirolli, M., Prandini, J. M., Moreira, H. 2016. Effects of N and P on biochemical composition of microalgae polyculture harvested from phycoremediation of piggery wastewater digestate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 178:1407–1419

BIBLIOGRAFIA

- Morales V. 2004. Producción de hortalizas bajo sistemas hidropónicos, técnica de la película de nutriente y cama de agua. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Mortimer, C.H. 1981. The oxygen content of air-saturated fresh waters over ranges of temperature and atmospheric pressure of limnological interest: E. Schweizerbart Science Publishers, Alemania. 23 p.
- Mufarrege, M. M., Hadad, H. R., Maine M. A. 2010. Response of *Pistia stratiotes* to Heavy Metals (Cr, Ni and Zn) and phosphorus. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 58: 53-61.
- Munns R., Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology. 59 : 651- 681.
- Olguín, E. J., Galicia, S., Mercado, G., Pérez, T. 2003. Annual productivity of *Spirulina* (Arthrospira) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. Journal of Applied Phycology 15: 249-257
- Olguín, E. J., Rodríguez, D., Sánchez, G., Hernández, E., Ramírez, M. E. 2003. Productivity protein content and nutrient removal from anaerobic effluents of coffee wastewater in *Salvinia minima* ponds, under subtropical conditions. Engineering in Life Sciences. 23: 259- 270.
- Olguín, E. J., Sánchez – Galván, G., Pérez – Pérez, T. 2007. Assessment of the phytoremediation potential of *Salvinia minima* Baker compared to *Spirodela polyrrhiza* in high strength organic wastewater. Water, Air and Soil Pollution. 181: 135-147
- Outridge, P. M., Hutchinson, T. C. 1991. Induction of cadmium tolerance by acclimation transferred between ramets of clonal fern *Salvinia minima* Baker. New Phytologist. 117. 597-605 .
- Owens, C. S., Smart, R. M. 2010. Effects of nutrients, salinity, and pH on *Salvinia molesta* (Mitchell) growth. APCRP Technical Notes Collection. ERDC/TN APCRP-EA-23. Vicksburg, MS: U.S. Army Engineer Research and Development Center.
- Pérez-Gutierrez, A., Dzul-Mukul, C., Borges-Gómez, L., Latournerie-Moreno, L., Ruíz-Rodríguez, E., Ayora-Ricalde, G. 2015. Uso potencial de aguas residuales de

BIBLIOGRAFIA

- criaderos de cerdo en la producción de *Capsicum chinense*. Revista Fitotecnia Mexicana. 38: 383-387.
- Pérez, R. 2002. Porcicultura y Contaminación en la Piedad, Michoacán, México. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 17:5-13 .
- Perl, R. T., Perl, A. 2010. Oxidative Stress: an introduction. En: Bansal, M., y Kaushal, N. 2014. Oxidative Stress Mechanism and their Modulation. 1° Edición. Springer-India. 1-18 pp
- Peterson, C., Rauser, W. E. 1979. Callose deposition and photoassimilate export in *Phaseolus vulgaris* exposed to excess Co, Ni and Zn. Plant Physiology 63. 1170-1174.
- Phetsombat, S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Upatham, S. 2006. Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in *Salvinia cucullata*. Journal of Environmental Biology 27: 645 – 652.
- Prado, C., Prado, F. E., Pagano, E., Rosa, M. 2015. Differential effects of Cr (VI) on the ultrastructure of chloroplast and plasma membrane of *Salvinia minima* growing in summer and winter. Relationships with lipid peroxidation, electrolyte leakage, photosynthetic pigments and carbohydrates. Water, Air and Soil Pollution .226: 1-12 pp.
- Puniram-Hartley, N., Hartley, J., Shabala, L., Shabala, S. 2014. Salinity-induced accumulation of organic osmolytes in barley and wheat leaves correlates with increased oxidative stress tolerance: In planta evidence for cross-tolerance. Plant Physiology and Biochemistry. 83. 32- 39 .
- Quiles, A. 2009. Efecto del zinc en la alimentación porcina. Universidad de Murcia.[Online].
- Disponible en:
axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/3/cys_3_Efecto_zinc.pdf.
[Acceso 14 de noviembre de 2016]
- Radíć, S., Babíć, M., Škobíć, Roje, V., Pevalek- Kozlina, B. 2009. Ecotoxicological effects of aluminum and zinc on growth and antioxidants in *Lemna minor* L. Ecotoxicology and Environmental Safety 73. 336-342.

BIBLIOGRAFIA

- Radulescu C., Stih, C, Popescu, I.v., Dulama, I.D., Chelarescu, E.D., Chilian, A. 2013. Heavy metal accumulation and translocation in different parts of *Brassica oleracea* L. Romanian. Journal of. Physiology. 58:1337-1354.
- Reddy, K. R., D'Angelo, E. M. 1997. Biogeochemical indicators to evaluate pollutant removal efficiency in constructed wetlands. *Water Science and Technology* .35 : 1- 10
- Room, P. M., Gill, J. Y. 1985. The chemical environment of *Salvinia molesta* Mitchell: ionic concentrations of infested waters. *Aquatic Botany* 23: 127-135.
- Rüdel, H., Kösters, J., Schörmann, J. 2008. Determination of elemental content of environment samples using ICP-OES. *Guidelines for Chemical Analysis*. 2: 2:11.
- Saeed, R., Mirza, S., Ahmad, R. 2014. Electrolyte leakage and relative water content as affected by organic mulch in okra plant (*Abelmoschus esculentus* L.) grown under salinity. *Fuuast Journal of Biology* 4 : 221-227
- Sagardoy R, Morales F, López-Millán AF, Abadía A, Abadía J (2009). Effects of zinc toxicity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. *Plant Biology* 11: 339-350.
- Sánchez- Viveros, G., Gonzáles- Mendoza, D., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R. 2010. Copper effects on photosynthetic activity and membrane leakage of *Azolla filiculoides* and *A. caroliniana*. *International Journal of Agriculture and Biology*. 12: 366-368.
- Sandmann, G., Böger,P. 1980. Copper induced exchange of plastocyanin and cytochrome C₅₅₃ in cultures of *Anabaena variabilis* and *Plectonema boriaunm*. *Plant Science Letters*. 17: 417- 424.
- Satpathy, D., Reddy, M. V., Dhal, S. P. 2014. Risk assessment of heavy metals contamination in paddy soil, plants and grains (*Oryza sativa* L.) at the East Coast of India. *BioMed Research International*. 2014.1-11.
- Schuerger, A. C., Capelle, G. A., Di-Benedetto, J. A., Mao, C., Thai, C. N., Evans, M. D., Richards, J. T., Blank, T. A., Stryjewski, E. C. 2002. Comparison of two hyperspectral imaging and two laser- induced fluorescence instruments for the

BIBLIOGRAFIA

- detection of zinc stress and chlorophyll concentration in bahia grass (*Paspalum notatum*) . Remote Sensing of Environment. 84. 572-588.
- Sela, M., Garty, J., Tel-or, E. 1989. The accumulation and effect of heavy metals on the water fern *Azolla filiculoides*. New Phytologist. 112: 7-12.
- Singh D., Tiwari A., Gupta, R. 2012. Phytoremediation of lead from wastewater using aquatic plants. Journal of Agricultural Technology. 8:1-11
- Singh, J., Hembram, P., Basak, J. 2014. Potential of *Vigna unguiculata* as a phytoremediation plant in the remediation of Zn from contaminated soil. American Journal of Plant Sciences.5: 1156-1162.
- Sridhar, B .B. M., Han, F. X., Diehl, S. V., Monts, D. L. Su, Y. 2007. Effects of Zn and Cd accumulation on structural and physiological characteristics of barley plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 19 :15-22
- Song, A., Li, P., Fan, F., Li, Zhaojun, Liang, Y. 2014. The effect of silicon on photosynthesis and expression of its relevant genes in rice (*Oryza sativa* L.) under high zinc stress. Plos One: 1-22 pp.
- Soria M., Cerrato R., Barra J., González G., Santos J., Gómez L., y Pérez G. 2001. Producción de biofertilizantes mediante biodigestión de excreta líquida de cerdo. Terra 19:353- 362
- Stobart, A.K., Griffiths, W.T., Ameen-Bukhari, I., Sherwood, R. 1985. The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. Physiologia Plantarum 63: 293-298 .
- Subba, P., Mukhopadhyay, M., Mahato, S. K., Bhutia, K. D., Mondal, T. K., Ghosh, S. K. 2014. Zinc stress induces physiological, ultra-structural and biochemical changes in mandarin orange (*Citrus reticulata*) seedlings. Physiology and Molecular Biology of Plants: 20. 461- 473.
- Sultan, S. E. 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. Trends in Plant Science. 5:537- 542.
- Suzuki, K., Waki M., Yasuda , T., Fukumoto, Y., Kuroda, K., Sakai, T., Suzuki, N., Suzuki, R., Matsuba, K. 2010. Distribution of phosphorus, copper and zinc in activated

BIBLIOGRAFIA

- sludge treatment process of swine wastewater. Biosource Technology 101. 9399-9404.
- Taiganides E., Pérez R y Girón, E. 1996. Manual para el manejo y control de aguas residuales y excretas porcinas en México. Consejo Mexicano de Porcicultura. México, DF
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M. 2006 . Plant Physiology and Development. Sinauer Associaes, Inc. Sexta Edición. Estados Unidos de América. 1338. p
- Trejo-G. K. 2012. Caracterización de la expresión diferencial de 6 genes en respuesta al plomo en *Salvinia minima* Baker. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Trejo W., Casso B., Castillo J., Caamal A., Santos R y Vázquez B. 2014. Manual de características del efluente y sedimento de biodigestores porcícolas en el Estado de Yucatán. Primer informe técnico. Proyecto Fomix- Conacyt.
- Vymazal, J., Kröpfelová, L. 2008. Wastewater treatment in constructed wetlands with horizontal sub-surface flow. 1^{era} Ed. Springer Netherlands. 314-pp.
- Wang, W., Yang, C., Tang, X., Zhu, Q., Pan, K., Cai, D., Hu, Q., Ma, D. 2015. Carbon and energy fixation of great duckweed *Spirodela polyrrhiza* growing in swine wastewater. Enviromental Sciences and Pollution Reseach. 22: 15804–15811.
- Whiteman, J. B., and Room, P. M. 1991. "Temperatures lethal to *Salvinia molesta* Mitchell," Aquatic Botany 40, 27-35.
- Wolff, G., Assis., L. R., Pereira, G. C., Carvalho, J. G., Castro, E. M. 2009. Effects of Zn toxicity on leaves of *Salvinia auriculata* cultivated in nutrient solution. Planta Daninha. 27:133-137.
- Wolff, G., Pereira, G.C., Castro, E.M., Louzada, J., Coelho, F.F. 2012. The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium concentration. Brazilian Journal of Biology. 72 : 71-77.

BIBLIOGRAFIA

- Xu, J., Cheng, J. J., Stemp, A.M. 2012. Growing *Spirodela polyrrhiza* in swine wastewater for the production of animal feed and fuel ethanol: A pilot study. *Clean- Soil, Air and Water*. 40: 760-775.
- Xu, J., Shen, G. 2011. Growing duckweed in swine wastewater for nutrient recovery and biomass production. *Bioresource Technology*. 101. 848-853
- Yabanh, M. Yozukmaz, A., Sel, F. 2004. Heavy metal accumulation in the leaves, stem and root of the invasive submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum* L. (Haloragaceae): An example of Kadin Creek (Mugla, Turkey). *Brazilian Archives of Biology and Techonology*. 57. 434-440.
- Yin, D., Chen, S., Chen, F., Guan, Z., Fang, W. 2009. Morphological and physiological responses of two chrysanthemum cultivars differing in their tolerance to waterlogging. *Environmental and Experimental Botany*. 67: 87-93.
- Yoon, J., Xinde C., Zhou, Q., Lena, Q.M. 2006 Accumulation of Pb, Cu and Zn in native plants growing on contaminated Florida Site. *Science of the Total Enviroment*.368: 456-464
- Yruela, I. 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 145-156
- Zalewska, M., Nogalska, A. 2014. Phytoextraction potential of sunflower and white mustard plants in Zn contaminated soil. *Chilean Journal of Agricultural Research*: 74:485-489 .
- Zaidi, P.H., Rafique, S., Singh, N. 2002. Response of maize (*Zea mays* L.) genotypes to excess soil moisture stress: morpho-physiological effects and basis of tolerance. *European Journal of Agronomy*. 19: 383-399.