# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

# SEDE QUITO

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Tesis previa a la obtención del título de:**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**"Determinación de la eficacia de *Azolla caroliniana* como matriz de hiperacumulación de metales pesados cuantificados"**

**AUTOR:**

**JOSÉ LUIS BALLESTEROS LARA**

**DIRECTOR:**

**QUIM. CHRISTIAN F. LARENAS URÍA**

**Quito, Diciembre de 2011**

## DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, el trabajo de investigación contenido en esta tesis, fue efectuado por José Luis Ballesteros Lara como estudiante de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, entre Mayo y Noviembre del 2011, bajo la supervisión del profesor Christian Larenas Uría.

Las Investigaciones reportadas en esta tesis no han sido utilizadas anteriormente para obtener otros grados académicos, ni serán utilizadas para tales fines en el futuro.

Quito, Diciembre - 16 - 2011

**(f)_____** **(f)_____**

**CHRISTIAN F. LARENAS URÍA** **JOSÉ LUIS BALLESTEROS LARA**

## DEDICATORIA

Para Galo, Ruth y Diana, mi hermosa familia, quienes comenzaron a ayudarme sin que yo lo supiera.

## AGRADECIMIENTO

A mi familia, por darme todo su apoyo y quererme por sobre todas las cosas.

A Christian Larenas, por brindarme su tiempo y estar siempre apoyándome con sus conocimientos y experiencias, para la realización de esta tesis.

A Tatiana Mosquera, Marco Cerna, Pablo Coba, Laura Huachi y María Belén Aldás, por su aporte, tiempo y esfuerzo para ayudarme de diferente manera a idear, realizar y culminar mi trabajo de tesis.

A todos mis amigos y compañeros, de manera especial a Gabriela Armas, Ángela Macas, Sandra Suarez, Patricia Chávez, Gonzalo Cueva, Erick Encalada, Gabriel Salazar y Marco Simbaña, por apoyarme siempre y brindarme su ayuda incondicional cuando ha sido necesario.

A la Universidad Politécnica Salesiana por su vocación de servicio.

**ÍNDICE GENERAL**


INTRODUCCIÓN ..... 1

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ..... 2
1. TEMA ..... 2
2. HIPÓTESIS ..... 2
3. OBJETIVOS ..... 3

3.1 OBJETIVO GENERAL ..... 3

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... 3
4. JUSTIFICACIÓN ..... 4

MARCO REFERENCIAL ..... 5
1. *Azolla caroliniana* ..... 5

1.1 ASPECTOS GENERALES DE *Azolla caroliniana* ..... 5

1.2 *Azolla caroliniana* EN ECUADOR ..... 7
2. BIOTECNOLOGÍA PARA LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS ..... 7
3. FITORREMEDIACIÓN ..... 8

3.1 FITORREMEDIACIÓN ACUÁTICA ..... 9
3.1.1 MACROFITAS ACUÁTICAS ..... 10
3.1.2 MICROALGAS ..... 11
4. TOXICIDAD DE METALES PESADOS EN VEGETALES ..... 11
5. MECANISMOS DE RESPUESTA DE LOS VEGETALES A LA PRESENCIA DE METALES PESADOS ..... 12

5.1 ADSORCIÓN DE METALES PESADOS A SUPERFICIES BIOLÓGICAS ..... 15

5.2 QUELANTES INTRACELULARES ..... 15
5.2.1 FITOQUELATINAS ..... 15

5.2.2 METALOTIONEÍNAS ..... 16
6. METALES PESADOS ..... 17
6.1 FUENTES DE METALES PESADOS ..... 18
6.2 FUENTES NATURALES Y ANTROPOGENICAS DE PLOMO Y CADMIO EN EL ECUADOR ..... 19
7. PLOMO ..... 20
7.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS ..... 20
7.2 TOXICIDAD DEL PLOMO ..... 21
7.3 FUENTES GENERADORAS DE PLOMO ..... 23
7.4 PLOMO EN EL ECUADOR ..... 23
8. CADMIO ..... 26
8.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS ..... 26
8.2 TOXICIDAD DEL CADMIO ..... 26
8.3 FUENTES GENERADORAS DE CADMIO ..... 29
8.4 CADMIO EN EL ECUADOR ..... 30
METODOLOGÍA ..... 32
1. CRECIMIENTO, ESTABILIZACIÓN Y DESARROLLO DE LA AZOLLA CAROLINIANA EN UN MEDIO CON CONDICIONES CONTROLADAS, RICO EN NUTRIENTES Y METALES PESADOS. ..... 32
1.1 RECOLECCIÓN DE *Azolla caroliniana* ..... 32
1.2 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *A.caroliniana* ..... 33
1.3 ACONDICIONAMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO PARA *Azolla caroliniana* ..... 34

1.3.1 UNIDADES EXPERIMENTALES....34
1.3.2 SUSTRATO....35
1.3.3 CONDICIONES AMBIENTALES....36
1.4 AJUSTE DE CONTAMINANTES....37
1.5 CARACTERÍSTICAS DE BIOMASA DE *A. caroliniana*....38
1.6 MONITOREO....38
2. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLOMO Y CADMIO ABSORBIDA POR EL HELECHO *Azolla caroliniana*....39
2.1 TRATAMIENTO PRELIMINAR DEL MATERIAL VEGETAL....39
2.2 DIGESTIÓN ÁCIDA EN BIOMASA....43
2.3 DIGESTIÓN ÁCIDA EN AGUA RESIDUAL (MEDIO DE CULTIVO)....45
2.4 DETERMINACIÓN DE PLOMO Y CADMIO EN MUESTRA VEGETAL Y EN MEDIO DE CULTIVO....47
2.5 FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN (FBC)....50
2.6 PORCENTAJE DE REMOCIÓN....50
3. ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO MÁS ADECUADO PARA LA COMPROBACIÓN DE LA FITORREMEDIACIÓN....51
3.1 INTENSIDAD LUMINOSA....51
3.2 NUTRIENTE....51
3.3 HUMEDAD Y TEMPERATURA....51
4. ANÁLISIS DE DATOS....52
5. EXPERIMENTO CON *A. caroliniana* EXPUESTAS A MEDIO ENRIQUECIDO CON METALES PESADOS....53

RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 54
1. CRECIMIENTO, ESTABILIZACIÓN Y DESARROLLO DE *Azolla caroliniana* EN UN MEDIO CON CONDICIONES CONTROLADAS, RICO EN NUTRIENTES Y METALES PESADOS. ..... 54
1.1 RECOLECCIÓN DE *Azolla caroliniana*..... 54
*1.2* IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *A.caroliniana* ..... 54
1.3 ACONDICIONAMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO PARA *A. caroliniana* ... 55
1.3.1 UNIDADES EXPERIMENTALES.....55
1.3.2 SUSTRATO.....55
1.3.3 CONDICIONES AMBIENTALES .....55
1.4 AJUSTE DE CONTAMINANTES..... 56
1.5 CARACTERÍSTICAS DE BIOMASA DE *A. caroliniana* ..... 57
1.6 MONITOREO..... 60
2. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLOMO Y CADMIO ABSORBIDA POR EL HELECHO *Azolla caroliniana*. ..... 62
2.1 DIGESTIÓN ÁCIDA EN BIOMASA Y EN AGUA ..... 62
2.2 CURVA DE CALIBRACIÓN EN ESTÁNDARES DE PLOMO Y CADMIO ..... 65
2.3 ABSORBANCIA Y CONCENTRACIÓN DE PLOMO Y CADMIO EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS..... 66
2.4 FACTOR DE BIOCONCENTRACION..... 68
2.5 PORCENTAJE DE REMOCIÓN ..... 70
3. ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO MÁS ADECUADO PARA LA COMPROBACIÓN DE LA FITORREMEDIACIÓN. ..... 71
3.1 INTENSIDAD LUMINOSA ..... 71

3.2 NUTRIENTE ..... 72

3.3 HUMEDAD Y TEMPERATURA ..... 73

4. ANÁLISIS DE DATOS ..... 75

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ..... 79

BIBLIOGRAFÍA ..... 82

ANEXOS ..... 89

## ÍNDICE DE GRAFICOS

GRÁFICO 1. ESQUEMA DE *Azolla caroliniana*..... 6

GRÁFICO 2. RESUMEN DE LOS MECANISMOS POTENCIALES CELULARES DISPONIBLES PARA LA DESTOXIFICACIÓN Y TOLERANCIA DE METALES EN PLANTAS. ..... 14

GRÁFICO 3. RECOLECCIÓN DE AZOLLA EN HUERTO ARELLANOS, PIFO-ECUADOR ..... 33

GRÁFICO 4. BOMBA DE AIRE DE DOBLE SALIDA MARCA COLE-PARMER..... 34

GRÁFICO 5. NUTRIENTE HIDROPÓNICO "NUTRIPON" ..... 35

GRÁFICO 6. ABSORCIÓN DEL EXCESO DE MEDIO DE CULTIVO A TRAVÉS DE UN EMBUDO ..... 40

GRÁFICO 7. BIOMASA DE *A. caroliniana* FRESCA EN CAJAS PETRI ..... 40

GRAFICO 8. BIOMASA DE *A. caroliniana* EN ESTUFA A 60ºC ..... 41

GRÁFICO 9. TRITURACIÓN DE LA BIOMASA DE *A. caroliniana* EN MORTERO DE CERÁMICA ..... 41

GRÁFICO 10. MUESTRA TRITURADA DE *A. caroliniana* EN TUBOS DE ENSAYO 42

GRÁFICO 11. MUESTRA DEL MEDIO DE CULTIVO EN FRASCO ÁMBAR..... 42

GRÁFICO 12. PESAJE DE BIOMASA EN BALANZA ANALÍTICA ..... 43

GRÁFICO 13. ADICIÓN DE ÁCIDO NÍTRICO A LA MUESTRA DE *A. caroliniana* .. 44

GRÁFICO 14. FILTRACIÓN EN MILLIPORE DE LA MUESTRA DIGERIDA DE *A. caroliniana* ..... 45

GRÁFICO 15. MEDICIÓN DEL AGUA RESIDUAL CON LA AYUDA DE UNA PROBETA ..... 46

GRÁFICO 16. VERTIDO DE LA MUESTRA DIGERIDA EN FRASCO DE CRISTAL 47

GRÁFICO 17. LECTURA DE LOS ESTÁNDARES PARA CURVA DE CALIBRACIÓN ..... 49

GRÁFICO 18. LECTURA DE MUESTRAS DE BIOMASA Y AGUA EN ABSORCIÓN ATÓMICA ..... 49

GRÁFICO 19. DIAGRAMA DEL EXPERIMENTO ..... 53

GRÁFICO 20. SOLUBILIDAD DEL NUTRIENTE Y DE LAS SALES EN EL MEDIO 56

GRÁFICO 21. DIGESTIÓN ÁCIDA DE BIOMASA UTILIZANDO UN MÉTODO MODIFICADO DE BERGHOF. ..... 63

GRÁFICO 22. DIGESTIÓN ÁCIDA DE AGUA FINAL UTILIZANDO UN MÉTODO MODIFICADO DE BERGHOF. ..... 64

GRÁFICO 23. PORCENTAJE DE REMOCIÓN EN RELACIÓN A LA INTENSIDAD LUMINOSA..... 72

GRÁFICO 24. PORCENTAJE DE REMOCIÓN EN RELACIÓN AL NUTRIENTE UTILIZADO ..... 73

GRÁFICO 25. PORCENTAJE DE REMOCIÓN EN RELACIÓN A LA HUMEDAD Y TEMPERATURA ..... 74

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. LÍMITES PERMITIDOS PARA CONTAMINANTES EN EL AGUA..... 12

TABLA 2. FUENTES DE METALES Y ELEMENTOS EN LA LISTA DE CONTAMINANTES PRIORITARIOS..... 19

TABLA 3. PLOMO EN MUESTRAS DE FRUTAS Y VERDURAS, CUENCA DEL PUYANGO 2001 ..... 24

TABLA 4. PLOMO DETECTADOS EN PECES, CAMARÓN Y LECHE DE CABRA . 25

TABLA 5. LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES PARA PLOMO Y CADMIO EN ECUADOR ..... 31

TABLA 6. COMPOSICIÓN DEL NUTRIENTE HIDROPÓNICO NUTRIPON..... 36

TABLA 7. MÉTODO DE DIGESTIÓN ÁCIDA PARA PLANTAS SECAS..... 44

TABLA 8. MÉTODO DE DIGESTIÓN ÁCIDA PARA EFLUENTES CON METALES PESADOS..... 46

TABLA 9. ASPECTO DE LA BIOMASA DESPUÉS DEL TIEMPO DE CONTACTO . 57

TABLA 10. PESO DE LA BIOMASA, NUTRIENTE Y METALES PESADOS INTRODUCIDOS..... 60

TABLA 11. MEDICIÓN DEL PH EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. ..... 61

TABLA 12. MEDICIÓN DE TEMPERATURA Y HUMEDAD EN LOS PUNTOS DE MONITOREO..... 61

TABLA 13. CURVA DE CALIBRACIÓN EN ESTÁNDARES DE PLOMO Y CADMIO ..... 65

TABLA 14. CONCENTRACIÓN DE PLOMO Y CADMIO EN AGUA FINAL..... 66

TABLA 15. CONCENTRACIÓN DE PLOMO Y CADMIO EN BIOMASA ..... 67

TABLA 16. FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS ..... 68

TABLA 17. PORCENTAJE DE REMOCIÓN PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS ..... 70

TABLA 18. TEST DE ANOVA Y TEST DE TUKEY PARA CADMIO EN AGUA FINAL ..... 75

TABLA 19. TEST DE ANOVA Y TEST DE TUKEY PARA PLOMO EN AGUA FINAL ..... 76

TABLA 20. TEST DE ANOVA Y TEST DE TUKEY PARA CADMIO EN BIOMASA 77

TABLA 21. TEST DE ANOVA Y TEST DE TUKEY PARA PLOMO EN BIOMASA .. 78

## ÍNDICE DE ECUACIONES

ECUACIÓN 1. FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN ..... 50

ECUACIÓN 2. PORCENTAJE DE REMOCIÓN ..... 50

## RESUMEN

### Determinación de la eficacia de *Azolla caroliniana* como matriz de hiperacumulación de metales pesados cuantificados.



Christian Larenas Uría y José Luis Ballesteros Lara

Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad –CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador

Autor para correspondencia: clarenas@ups.edu.ec


---


Los metales pesados constituyen un riesgo grave de salud porque se acumulan en los suelos, el agua y los organismos. Uno de los métodos de eliminación de estos contaminantes del agua y el suelo es el uso de plantas (fitorremediación). Hay muchas plantas (hiperacumuladoras) que tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de metales pesados. Uno de ellos es el helecho acuático *Azolla caroliniana*, planta usada en este trabajo de tesis. El objetivo de este estudio fue verificar la capacidad de *Azolla caroliniana* Willd como matriz hiperacumuladora de metales pesados como Pb y Cd en aguas contaminadas. Durante el experimento, *A. caroliniana* fue cultivada en una solución de agua enriquecida con Pb y Cd, cada uno a concentraciones de 1, 2, 3 y 4 partes por millón respectivamente, además se le proporcionó condiciones ambientales modificadas como intensidad de luz, temperatura y humedad. La presencia de plomo y cadmio causó una inhibición del crecimiento de *A. caroliniana* por acerca de 20 % y 70 % respectivamente. Al finalizar el experimento, el contenido de los metales de la prueba fue determinado tanto en el medio acuoso como en la biomasa. En el agua, la disminución de Pb fue de 85% y la de Cd de 75%. En los tejidos de *A. caroliniana*, el factor de bioconcentración de plomo fue de hasta 6,50, y de cadmio hasta 4,45.



**Palabras clave:** Azolla, bioacumulación, metales pesados, plomo, cadmio

## ABSTRACT

**Determination of the effectiveness of *Azolla caroliniana* as an array of heavy metal hyper accumulation quantified.**



Christian Larenas Uría and José Luis Ballesteros Lara

Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad –CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador

Author for correspondence: clarenas@ups.edu.ec


---


Heavy metals are a serious health risk because they accumulate in the soil, water and organisms. One method of removing these contaminants from water and soil is the use of plants (phytoremediation). There are many plants (hyperaccumulators) that have the ability to accumulate large amounts of heavy metals. One is the water fern *Azolla caroliniana*, plant used in this thesis. The aim of this study was to verify the ability of Azolla caroliniana Willd as matrix hyperaccumulators of heavy metals like Pb and Cd in polluted water. During the experiment, *A. caroliniana* was grown in a solution of water enriched with Pb and Cd, each at concentrations of 1, 2, 3 and 4 parts per million respectively, also was provided with modified environmental conditions as light intensity, temperature and humidity. The presence of lead and cadmium caused a growth inhibition of A. caroliniana by about 20% and 70% respectively. At the end of the experiment, the metal content of the test was determined both in the aqueous medium as biomass. In water, the reduction of Pb was 85% and 75% Cd. In the tissues of *A. caroliniana*, the lead BAF was up 6.50, and cadmium to 4.45.



**K e y w o r d s:** *Azolla*, bioaccumulation, heavy metals, lead, cadmium

# INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la problemática de la contaminación con metales pesados en las aguas de ríos y mares se está incrementando a la par con el crecimiento del desarrollo industrial y tecnológico no sustentable. Los metales pesados han sido reconocidos como peligrosos para la salud del hombre y la biota acuática, dados los impactos negativos que pueden generarse incluso cuando estos se encuentren en concentraciones muy bajas. “La presencia de elevadas concentraciones de estos contaminantes en el agua, así como la falta de tratamiento de los mismos, traen como consecuencia el daño a los ecosistemas, enfermedades al ser humano, pérdida de especies, falta de suministro de agua potable, intoxicación de peces, problemáticas sociales y demás efectos negativos” (Novotny, 1996).

El desarrollo de tecnologías para la remediación de aguas contaminadas con metales pesados es una prioridad en Ecuador debido a que el país cuenta con industrias en crecimiento en la que se descargan este tipo de contaminantes en sus aguas residuales y no se les da un tratamiento adecuado. “Además es muy importante diseñar tecnologías adecuadas al contexto socio-económico y ambiental de países en desarrollo, como Ecuador, aprovechando su amplia diversidad vegetal y sus condiciones climáticas únicas en el mundo” (Howard, 2000).

Por lo anterior, el presente trabajo reviste relevancia dado que investiga el uso de una planta acuática (*Azolla caroliniana*) en la remoción de cadmio y plomo en agua, el mecanismo de dicho fenómeno y la influencia de factores ambientales en el mismo. Además, esta investigación ofrece las bases de diseño para el desarrollo de sistemas de fitorremediación acuática con esta planta debido a la alta capacidad que tiene para hiperacumular metales pesados, así como a las múltiples ventajas que presenta en comparación a otras macrófitas acuáticas; para la futura aplicación de esta biotecnología, considerándola una alternativa viable para nuestro país.

# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

## 1. TEMA

Determinación de la eficacia de *Azolla caroliniana* como matriz de hiperacumulación de metales pesados cuantificados.

## 2. HIPÓTESIS

***Alternativa***

*Azolla caroliniana* captura por hiperacumulación los metales pesados (Plomo y Cadmio) presentes en el medio.

***Nula***

*Azolla caroliniana* no captura por hiperacumulación los metales pesados (Plomo y Cadmio) presentes en el medio.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia de *Azolla caroliniana* como método de fitorremediación de plomo y cadmio en un medio controlado.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Lograr el crecimiento, estabilización y desarrollo de *Azolla caroliniana* en un medio con condiciones controladas, rico en nutrientes y metales pesados.
- Cuantificar la concentración de Plomo y Cadmio absorbida por el helecho *Azolla caroliniana*.
- Estandarizar el proceso más adecuado para la comprobación de la fitorremediación.

## 4. JUSTIFICACIÓN

El uso de procesos biológicos en la remediación de ambientes contaminados presenta algunas ventajas comparativas respecto de las tecnologías tradicionales: suele ser más económico, menos contaminante y de mayor eficacia para grandes volúmenes y pequeñas concentraciones. Los metales pesados, a diferencia de los contaminantes orgánicos, no pueden ser degradados, por ello, los procesos de remediación se reducen a provocar la movilización y/o inmovilización de los mismos (Flathman, 1998).

En el caso de efluentes contaminados con iones metálicos, es posible utilizar plantas capaces de acumularlos retirándolos de los cursos de agua. Precisamente, dichos iones metálicos se han encontrado en ríos de la amazonia ecuatoriana así como también en lagos importantes de la serranía como en el caso del lago Yaguarcocha al norte de Ibarra (Escobar, 2002). Es por eso que esta tesis está dedicada al estudio del helecho acuático *Azolla caroliniana* Willd y a su posterior uso para la captación de iones metálicos bajo la forma de sales. Los metales pesados analizados en este trabajo han sido plomo y cadmio; estos elementos fueron elegidos debido a que son empleados en un gran número de procesos industriales y por lo tanto se los puede hallar en efluentes provenientes de diversas industrias, además estos metales pesados, son peligrosos para la salud ya que se acumulan en el cuerpo humano causando graves enfermedades que a mediano plazo pueden llegar a ser letales (Cavallaro, 2003).

En este sentido, en nuestro país, la biotecnología puede convertirse en una opción viable, ofreciendo una manera natural de la aplicación de métodos alternativos para el tratamiento de metales pesados en los efluentes de residuos industriales y municipales, disminuyendo de esta forma los costos y aumentando la eficiencia de tratamiento.

# MARCO REFERENCIAL

## *1. Azolla caroliniana*

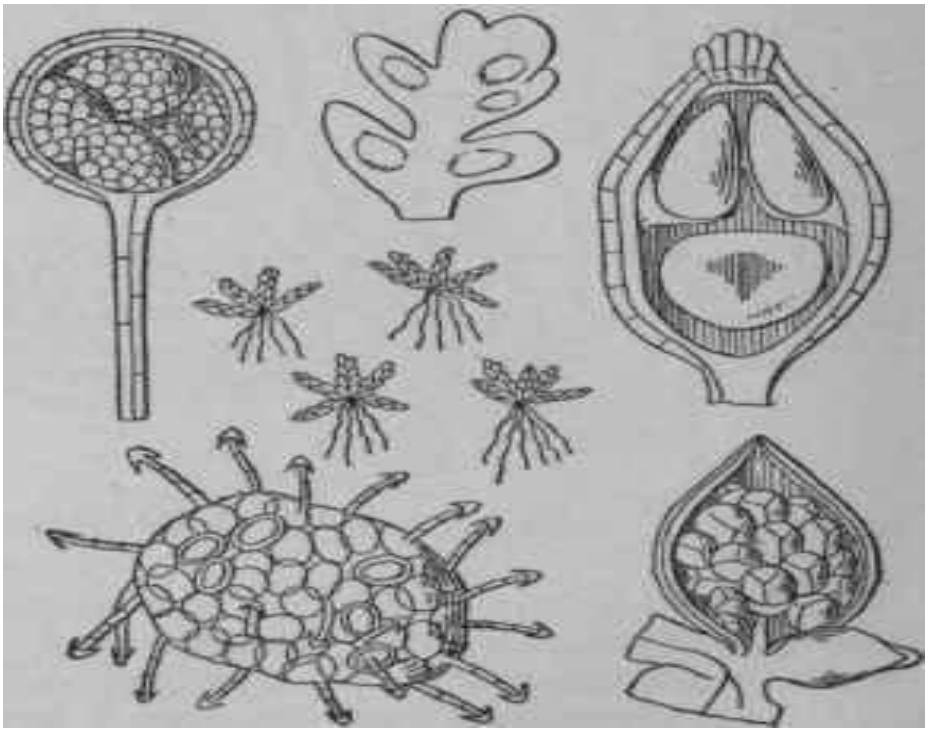
### 1.1 ASPECTOS GENERALES DE *Azolla caroliniana*

El helecho acuático *Azolla caroliniana* Willd es una planta pequeña, perteneciente a la familia Salvinaceae, común en muchas partes del mundo, especialmente en ambientes tropicales (véase gráfico 1). Este helecho presenta las siguientes características:

- Planta acuática flotante. Hojas pequeñas con raíces cortas.
- Realiza simbiosis con cianobacterias como la *Anabaena azollae* Strasb, que se puede unir al nitrógeno atmosférico
- Frondes divididos cuyo color oscila entre rojo y púrpura a pleno sol y de verde pálido a verde azulado en la sombra.
- Crecimiento muy rápido. Se multiplica por brote lateral. Crece a luz completa o semisombra
- Ayuda a controlar el desarrollo de las algas al limitar la disponibilidad de la luz.
- Las heladas invernales la dañan. Se seca si pierde el contacto con el agua.
- Se puede abonar las plantas acuáticas utilizando abonos específicos, derretidos en el espejo de agua cerca de las plantas; existen también granos o pastillas de lenta liberación, que se deben enterrar cerca de las plantas, cuya acción dura 3-4 meses.

- Es preferible cultivar la *Azolla caroliniana* en un lugar luminoso, con luz solar directa y en un lugar que tenga poco viento.
- Estas plantas crecen cubriendo todo el espacio que tienen a disposición.
- La *Azolla caroliniana* Willd alcanza de 1-2 cm de altura
- Alberga un alga de color azul-verde bajo sus hojas. Esta alga es capaz de absorber nitrógeno del aire, que luego es utilizado por la planta.
- Se debe tener cuidado y si es necesario aplicar un insecticida de amplio espectro con un fungicida sistémico, para prevenir el ataque de parte de los áfidos y el desarrollo de enfermedades causadas por hongos, a menudo favorecidas por el clima fresco y húmedo. (Monserrat y Celsi, 2005).

**Gráfico 1. Esquema de *Azolla caroliniana***



**Fuente:** chestofbooks, 2011

### 1.2 *Azolla caroliniana* EN ECUADOR

El género Azolla se encuentra repartido en el Ecuador en diferentes provincias dependiendo de sus especies en particular (*A. caroliniana, A. filiculoides* y *A.mexicana*). La *Azolla caroliniana* se encuentra mayoritariamente en la provincia de Guayas, a una altitud de 0-500msnm. También se la puede cultivar en zonas más templadas ya que es un helecho de fácil adaptación (Jörgensen y León-Yanez, 1999).

## 2. BIOTECNOLOGÍA PARA LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS

Los métodos convencionales y procesos existentes para la remoción de metales pesados de aguas residuales son principalmente la precipitación, coagulación, intercambio iónico, filtración, y ultra-filtración. Sin embargo, estos procesos requieren demasiadas construcciones (por ejemplo tanques, estaciones de bombas y batidoras), así como una gran cantidad de compuestos químicos, energía, y personas capacitadas. Estos métodos, además, generan grandes volúmenes de lodos para ser procesados, los cuales presentan a su vez un alto costo en su tratamiento (Howard, 2000).

La biotecnología ambiental se basa en el desarrollo, uso y regulación de sistemas biológicos para la remediación de ambientes contaminados (suelo, aire, agua), para la preservación del medio ambiente y para el uso sustentable de recursos. La biotecnología es también una herramienta esencial para conseguir una de las tareas más importantes de la humanidad: conciliar el desarrollo y el crecimiento económico en armonía con la explotación sostenida y racional de recursos (Olguin, 1994).

## 3. FITORREMEDIACIÓN

La fitorremediación puede definirse como una tecnología sustentable que se basa en el uso de plantas para reducir *in situ* la concentración o peligrosidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos en agua, suelo y aire; a partir de procesos bioquímicos realizados por las plantas y microorganismos asociados a su sistema de raíz que conducen a la reducción, mineralización, degradación, volatilización y estabilización de los diversos tipos de contaminantes (Flathman, 1998).

La fitorremediación puede dividirse en distintos tipos y categorías. La fitorremediación asistida por agentes quelantes, conocida como fitoquelación, se basa en la aplicación de agentes quelantes como el EDTA (etilenadimina tetracetato), para atrapar y solubilizar los metales disponibles en el suelo, seguido de una acumulación pasiva de los complejos metálicos en las partes aéreas de las plantas en la corriente de transpiración (Delgadillo y González, 2011).

Otra variante de la fitorremediación es la fitovolatilización, en donde los contaminantes no son acumulados primordialmente en los tejidos aéreos de la planta, en este caso son transformados por la planta en compuestos volátiles que se liberan a la atmósfera (Gagneten, 2008).

La fitofiltración es otra de las categorías utilizadas, en esta se utilizan partes de las plantas como filtros o bioabsorbentes en columnas por las cuales se hará pasar el agua contaminada y de esta forma remover los metales, ya que éstos se unen o pegan a la pared celular de la biomasa vegetal presente en la columna. Una vez que se satura el material vegetal en la columna se pueden reobtener los metales por métodos de desprendimiento (Cunningham y Berti, 1993).

La fitoacumulación es en la cual se cultivan plantas tolerantes a altas concentraciones de metales pesados para absorberlos y acumularlos en sus partes aéreas principalmente. Al final del período de crecimiento las plantas son cosechadas, secadas o incineradas y los

materiales ricos en contaminantes son depositados en contenedores especiales o añadidos a una fundidora en donde se recuperan (Sánchez, 1999).

## 3.1 FITORREMEDIACIÓN ACUÁTICA

El fundamento de este tipo de tratamiento consiste en que los compuestos presentes en el agua son adsorbidos e incorporados dentro de la estructura de las plantas, logrando eliminar la contaminación del agua y favoreciendo la restauración de la calidad de la misma (Hutchinson, 2001).

Las lagunas con plantas acuáticas para el tratamiento de aguas residuales, se basan en principios ecológicos, en donde los efluentes son tratados eficientemente mediante relaciones mutuas y coordinadas de flujo de energía y nutrientes, entre las plantas acuáticas y los microorganismos degradadores. Además, con base en los estudios de remoción de compuestos tóxicos por las plantas acuáticas, se pueden considerar a los sistemas de fitorremediación acuática como una alternativa ecológica y económicamente viable, no solo para el tratamiento de los efluentes municipales sino también para efluentes industriales (Olguín, 1994).

En la rizofiltración, los metales son adsorbidos y/o absorbidos por las raíces de las plantas. Se basa exclusivamente en hacer crecer, en cultivos hidropónicos, raíces de plantas terrestres con alta tasa de crecimiento y área superficial para absorber, concentrar y precipitar metales pesados de aguas residuales contaminadas (Cunningham y Berti, 1993).

Se han realizado muchos estudios para comprobar la fitorremediación acuática de metales pesados utilizando especies diferentes, por ejemplo Uysal y Taner en 2009, utilizaron *Lemna minor* en concentraciones iniciales de 1 a 10 ppm de plomo y analizaron también como pueden influir factores como el pH y la temperatura en todo el proceso.

### 3.1.1 MACRÓFITAS ACUÁTICAS

Las macrófitas acuáticas se pueden convertir en una herramienta muy útil en el tratamiento de aguas residuales, dándoles un manejo adecuado para aprovechar sus capacidades de absorción de nutrientes y bioacumulación de otros compuestos del agua (Boyd, 1990).

En la actualidad, la aparición de macrófitas acuáticas está relacionada con la química del agua. Además, las comunidades de estas especies de plantas se han usado como bioindicadores y tienen como objetivo el estudio de calidad del agua. Las macrófitas acuáticas se utilizan con frecuencia para vigilar la contaminación de agua dulce por metales pesados y plaguicidas en las zonas tropicales y regiones subtropicales, debido a su abundancia y la gran biomasa producida. Los sistemas de depuración basados en macrófitas consisten generalmente en un monocultivo o policultivo de éstas, dispuestos en tanques, lagunas o zanjas poco profundas y con un tiempo de retención superior al de los sistemas convencionales (Ansola, 2003).

Por otro lado, las macrófitas acuáticas, usadas para el tratamiento de aguas residuales deben contar con las siguientes características: alta productividad, alta eficiencia de remoción de nutrientes y contaminantes, alta predominancia bajo condiciones naturales adversas, adaptabilidad al clima de la región, capacidad de transporte de oxígeno de la superficie a la rizósfera y fácil cosecha. Asimismo, las macrófitas acuáticas flotantes han sido utilizadas en la fitorremediación gracias a sus características de acumular o hiperacumular metales y metaloides (Welsh, 1991).

La fitorremediación con macrófitas acuáticas para la remoción de metales pesados compite con otros tratamientos secundarios como por ejemplo la precipitación, siendo el principal mecanismo la adsorción a través de las raíces. Para las macrófitas acuáticas que poseen raíces pero no tienen contacto directo con los sedimentos, el agua es indudablemente la principal fuente de elementos (Denny, 1987).

### 3.1.2 MICROALGAS

Además de las plantas, las algas también son usadas para fines de fitorremediación y se ha probado la efectividad de hiperacumulación de metales pesados que tienen las mismas. Existen varios estudios en donde se reportan múltiples algas resistentes a metales pesados (Nishikawa, 2001).

Se han utilizado diversas algas para poder entender mejor los mecanismos de acumulación de metales. Se han realizado estudios en donde se prueban que la *Spirulina* y *Chlamydomonas* tienen gran habilidad para acumular metales pesados como cinc, plomo y cobre (Payne, 2000).

## 4. TOXICIDAD DE METALES PESADOS EN VEGETALES

La toxicidad puede resultar de la unión de metales a grupos sulfhídricos en proteínas, conduciendo a una inhibición de actividades o defectos en la formación de la estructura de las células, o desplazando un elemento esencial dando como resultado deficiencias en el metabolismo de las plantas. Además, el exceso de metales pesados puede estimular la formación de especies reactivas con oxígeno, resultando en estrés oxidativo. Las plantas tienen diversos mecanismos potenciales a nivel celular que pueden estar involucrados en la detoxificación y de esta manera en la tolerancia a metales pesados (Dietz, 1972).

Debido a las problemáticas de contaminación y toxicidad que pueden causar los metales pesados, la Norma INEN (980-981) (Tabla 1), establece los límites permisibles de contaminantes en aguas, considerando cianuros y metales pesados como: arsénico, cadmio, cobre, plomo, cromo, mercurio, etc.

**Tabla 1. Límites permitidos para contaminantes en el agua**

| REFERENCIA | EXPRESADO COMO | VALOR (mg/L) |
|---|---|---|
| Arsénico | As | 0,01 |
| Bario | Ba | 1,0 |
| Cadmio | Cd | 0,01 |
| Cinc | Zn | 15,0 |
| Cloruros | Cl- | 250,0 |
| Cobre | Cu | 1,0 |
| Cromo | Cr6+ | 0,05 |
| Mercurio | Hg | 0,002 |
| Nitratos | N | 10,0 |
| Nitritos | N | 1,0 |
| Plata | Ag | 0,05 |
| Plomo | Pb | 0,01 |
| Selenio | Se | 0,01 |

**Fuente:** Norma Ecuatoriana INEN 980-981

## 5. MECANISMOS DE RESPUESTA DE LOS VEGETALES A LA PRESENCIA DE METALES PESADOS

Las plantas tienen diferentes mecanismos de respuesta ante la presencia de compuestos tóxicos como los metales pesados. Entre ellos, destacan los mecanismos de exclusión, mineralización, reducción, solubilización, acumulación, quelación y translocación (véase gráfico 2). Algunos son pasivos, como la adsorción por exclusión y otros son activos, es decir, que requieren energía metabólica para llevarse a cabo, como la acumulación, translocación o relocalización. La translocación es un tipo de alteración de un patrón de compartamentalización del metal, es decir, algunas plantas translocan o transfieren el

exceso de metal a las hojas viejas, otras limitan el transporte de la raíz al tallo (Reed, 1990).

La vacuola tiene un funcionamiento especial en el almacenamiento de metales. Los iones metálicos se transportan de manera activa al interior del tonoplasto como iones libres o como complejos metal-molécula quelante (Moreno, 1999).

La pared celular vincula la disminución de permeabilidad de la membrana celular, y en algunas ocasiones activa la extrusión, al absorción por orgánulos y vacuolas o complejación con agentes quelantes tales como las proteínas, por ejemplo, metalotioneínas y fitoquelatinas (Rauser, 1999).

Los procesos de destoxificación que usualmente se conocen son la adsorción y la bioacumulación. En años recientes, la habilidad de las plantas para acumular contaminantes ha recibido mayor atención. Además, se han encontrado algunas especies con la capacidad de acumular altas concentraciones de metales pesados en su biomasa las cuales son llamadas "hiperacumuladoras" (Black, 1995).

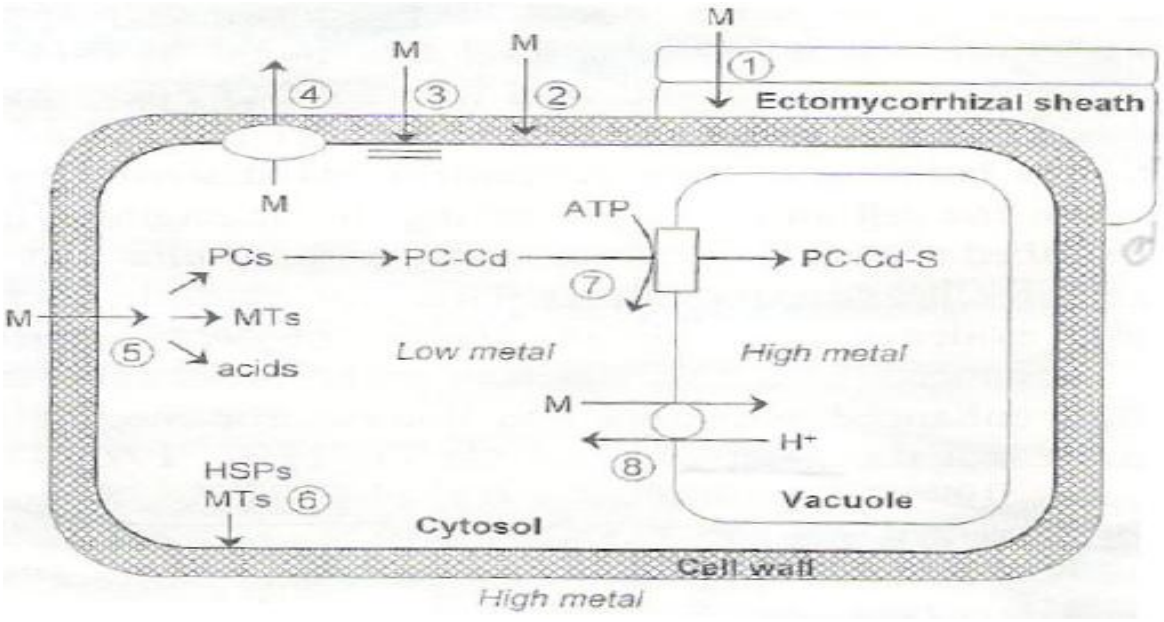
La hiperacumulación combina los aspectos de adsorción, transporte y translocación de metales. Se considera que existe hiperacumulación en las plantas, cuando la concentración del metal acumulado en los tejidos de las plantas se encuentra en el rango de 0,1-1% del peso seco de la planta, este porcentaje es particular para diferentes metales. Hasta la fecha, han sido reportadas más de 430 especies como hiperacumuladoras de metales pesados desde hierbas anuales hasta arbustos perennes y árboles. Por ejemplo, manglares como *Avicenia*, han sido reportados como hiperacumuladores de cobre, plomo y zinc (Mac, 2002).

Hiperacumuladora es una planta que contiene una mayor concentración de metales pesados en su biomasa de la que existe en el suelo u agua en la que se encuentre e hipertolerante es que posee mecanismos internos de detoxificación que le permiten secuestrar metales y metaloides en la vacuola. El factor de bioconcentración en plantas hiperacumuladoras, es decir, la proporción de concentración de metal en su biomasa con respecto a la del agua u suelo, es generalmente mayor a 1 y llega a alcanzar niveles muy superiores (McGrath y Zhao, 2003).

Las estrategias para evitar que los metales pesados aumenten en las plantas son diversas. Extracelularmente se incluyen las micorrizas, la pared celular y exudados extracelulares. La tolerancia puede además involucrar la membrana plasmática y el citosol. Dentro del protoplasto existe una variedad de mecanismos potenciales, por ejemplo, para la reparación de los daños de estrés se ha involucrado a proteínas de choque térmico o a las metalotioneínas, así como la quelación de metales por ácidos orgánicos, aminoácidos o péptidos, o su compartamentalización a procesos metabólicos para el transporte dentro de la vacuola (Tomotada, 2001).

**Gráfico 2. Resumen de los mecanismos potenciales celulares disponibles para la destoxificación y tolerancia de metales en plantas.**

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




**Fuente:** Marschner, 1995.

## 5.1 ADSORCIÓN DE METALES PESADOS A SUPERFICIES BIOLÓGICAS

La adsorción es un proceso por el cual las moléculas se adhieren a superficies sólidas. La adsorción física no es específica, y las fuerzas que atraen a las moléculas a las superficies de los sólidos son relativamente frágiles. La energía de activación por adsorción física usualmente no es mayor de una Kcal/gmol. En la adsorción, los iones metálicos son secuestrados de la solución a través de algunos mecanismos como intercambio iónico, quelación, adsorción por fuerzas físicas y atrapamiento de iones. En general, los mecanismos de remoción son diferentes entre las distintas especies de plantas y estarán determinados por el tipo de metal. Sin embargo, la adsorción es sin duda el mecanismo de remoción extracelular más reportado en plantas acuáticas (Salager, 1998).

## 5.2 QUELANTES INTRACELULARES

Por otro lado, a nivel intracelular los metales forman complejos con un ligando existente o sintetizado, que pueden ser ácidos orgánicos, algunos aminoácidos, metalotioneínas y fitoquelatinas, siendo los dos últimos los más importantes (Navarro, Aguilar y Lopez, 2007).

### 5.2.1 FITOQUELATINAS

Estas moléculas son péptidos sintetizados enzimáticamente que juegan un papel importante en la homeostasis y detoxificación de metales pesados. Son de bajo peso molecular (<10 $kD_a$), consisten en tres aminoácidos: cisteína, glicina y ácido glutámico. Las fitoquelatinas (FQs), derivan del glutatión y se polimerizan para formar péptidos

secuestradores de metales pesados en muchas especies de plantas y microorganismos. La síntesis de fitoquelatinas es citoplásmica, comienza con la respuesta de la planta a un metal pesado por la activación de la enzima fitoquelatina sintasa, que actúa sobre un sustrato de glutatión para producir fitoquelatinas (Ramírez, 1998).

Además, la reacción catalizada por la enzima no requiere de ATP, solo de la presencia de un metal pesado en altas concentraciones, el cual actúa como un activador esencial de la enzima (Porta y Caffini, 1998).

Se asume que la principal función de las fitoquelatinas tiene que ver con la destoxificación de metales no esenciales (micronutrientes), particularmente de hierro, cobre y zinc. Se sabe que una amplia variedad de metales pueden inducir la formación de fitoquelatinas, entre ellos el cadmio, níquel, cobalto, plomo, plata, zinc, cobre, aluminio, arsénico, selenio y mercurio (Nuñez y Vong, 2004).

### 5.2.2 METALOTIONEÍNAS

Son proteínas de bajo peso molecular (<40 kDa) que carecen de aminoácidos aromáticos y que pueden sintetizarse por las bacterias, plantas, hongos, invertebrados y mamíferos. También se conocen como polipéptidos ricos en cisteína codificados genéticamente (Valls, 1999).

Estas proteínas contienen largas fracciones de residuos de cisteína y muestran alto contenido metálico con iones coordinados en grupos metal-tiolato. Se ha propuesto que están involucradas en el metabolismo y la homeostasis de los metales esenciales, más que en la destoxificación de metales pesados (Nuñez y Vong, 2004).

## 6. METALES PESADOS

Los metales pesados son un grupo de elementos de alta prioridad sanitaria, debido a su alta toxicidad sobre la mayoría de los organismos, a su ubicuidad y a que se pueden bioacumular a través de las cadenas tróficas en ecosistemas acuáticos y terrestres. Éstos tienen una densidad superior a 4,5 $g/cm^3$, y aunque algunos son esenciales en el metabolismo de los seres vivos, como el cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, vanadio, estroncio, y zinc, en concentraciones muy elevadas éstos son demasiado tóxicos y pueden ocasionar daños irreversibles. Algunos otros como el cadmio y el mercurio son muy tóxicos inclusive a concentraciones muy bajas. Los metales pesados además tienden a persistir en el ambiente, dada su resistencia a la degradación química o biológica (Salomons, 1995).

Actualmente en Ecuador, el agua se ha convertido en elemento central de la política ambiental; su disponibilidad y distribución condiciona la posibilidad de desarrollo de algunas regiones del país y su calidad es el factor determinante para la salud y bienestar de la humanidad y del medio ambiente en general. Debido a ello, el aumento de la contaminación en las aguas superficiales y marinas se está convirtiendo en una amenaza de altas proporciones por la presencia de elevadas concentraciones de metales pesados como el plomo, cadmio, cromo y níquel (Moreno, 1999).

Esta problemática se ha acrecentado debido al mal manejo de las descargas industriales y al ineficiente tratamiento que se les da a las mismas. Uno de los métodos para reducir el contenido de metales pesados en el medio ambiente es el uso de plantas para eliminarlos del sustrato. (Argibay y Cassano, 2010).

Las enfermedades relacionadas con el agua contaminada son una tragedia humana que cada año cobra la vida de más de 5 millones de personas, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS). Como resultado de esta problemática, los costos del cuidado de la salud causados por aguas contaminadas representan tres mil millones de dólares anualmente a nivel mundial (Frenk, 1993). Además la Organización de las

Naciones Unidas (ONU), ha reportado que el agua contaminada causa el 80% de las enfermedades del mundo, la mayor parte de los que sufren estas enfermedades son niños menores de 5 años de acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO).

## 6.1 FUENTES DE METALES PESADOS

Los metales son algunos de los elementos abundantes en la corteza de la tierra. Los minerales tales como los enlistados en la Tabla 2, representan la fuente original de los metales encontrados en suelos y ambientes acuáticos.

Las fuentes de metales urbanas e industriales han sido identificadas como la causa principal de contaminación por metales tóxicos. Los orígenes de estos compuestos tóxicos son muy diversos. Las más obvias son las operaciones industriales como son las fundiciones, fábricas, y de plantas mineras. Algunas de las industrias que generan aguas residuales contaminadas por metales, y de plantas mineras. Algunas de las industrias que generan aguas residuales contaminadas por metales pesados entre otros contaminantes son: azucarera, petrolera, cervecera, textil, celulosa y papel, acabados metálicos, cobre y sus aleaciones, curtiduría, alimenticias, hierro y acero. Estas fuentes son legalmente clasificadas como focos puntuales de contaminación, aunque el escurrimiento de estos complejos es considerado como una fuente difusa (Laubstein, 2010)

**Tabla 2. Fuentes de metales y elementos en la lista de contaminantes prioritarios.**

| Elemento | Fuentes naturales de metales (metales minerales) |
|---|---|
| Antimonio | $Sb_2S_3$ Manantiales geotérmicos, minas |
| Arsénico | Arsenito ($HA_sO_2$), gases volcánicos, manantiales geotérmicos |
| Berilio | Beril $Be_3Al_2Si_6O_{16}$ |
| Cadmio | Carbonato de zinc y minerales de sulfuro, carbonato de cobre. |
| Cromo | Cromita ($FeCr_2O$), oxido crómico ($Cr_2O_3$) |
| Cobre | Metal libre (Cu°), sulfuro de cobre ($CuS_2$), calcopirita ($CuFeS_2$) |
| Plomo | Galena (PbS) |
| Mercurio | Metal libre (Hg°), cinabrio (HgS) |
| Níquel | Minerales de ferromagnesio, minerales de sulfuro ferroso, óxido de níquel ($NiO_2$), hidróxido de níquel ($Ni(OH)_3$) |
| Selenio | Elemento libre (Se°) Ferroselita ($FeSe_2$), depósitos de uranio |
| Plata | Metal libre (Ag°), cloruro de plata ($AgCl_2$), cobre, plomo, minerales de zinc |
| Talio | Cobre, plomo, residuos de plata |
| Zinc | Calamina ($ZnCO_3$), minas |

**Fuente:** Salomons, 1995

Otras fuentes importantes de contaminación por metales en las zonas urbanas son: los tejados metálicos, canalones y bajantes, tuberías metálicas oxidadas, tuberías de plomo viejas, depósitos de automóviles y vertederos de basura y desechos sólidos, muchos de ellos insalubres y que emiten contaminantes (Gil y Torres, 2006).

## 6.2 FUENTES NATURALES Y ANTROPOGENICAS DE PLOMO Y CADMIO EN EL ECUADOR

El Ecuador, a medida que se ha ido industrializando, también se ha ido contaminando a tal punto de llegar a sobrepasar los límites permisibles, haciendo que contaminantes como los metales pesados se bioacumulen y biomagnifiquen a lo largo de las cadenas alimentarias. Las principales fuentes de contaminación con plomo y cadmio son:

**Plomo**

- Fundición de metales (placas de baterías y residuos de plomo)
- Cerámica vidriada
- Fabricación de pinturas
- Industria electrónica y de cómputo
- Cristal
- Plásticos
- Pilas

**Cadmio**

- Baterías, pilas
- Pigmentos y Estabilizadores en Plástico y PVC
- Pigmentos en Pinturas
- Galvanización
- Catalizadores y Conservadores en la Industria del Plástico
- Aleaciones (Garzón, 2006)

# 7. PLOMO

## 7.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS

El plomo es el metal pesado más abundante en la naturaleza, tiene una densidad relativa o gravedad específica 11,4 a 16ºC. Físicamente el plomo es de color azuloso, se empaña para adquirir un color gris mate, es flexible, inelástico y se funde con facilidad. Su punto de fusión es 327,4ºC y el de ebullición es 1725ºC. Las valencias químicas normales son 2+ y 4+. Químicamente, combinado con otros elementos forma compuestos con características únicas y altamente útiles, tiene la capacidad de formar muchas sales,

óxidos y compuestos. Es relativamente resistente al ataque de ácido sulfúrico y ácido clorhídrico, aunque se disuelve con lentitud en ácido nítrico y ante la presencia de bases nitrogenadas. (Gutiérrez y Izquierdo, 2004).

## 7.2 TOXICIDAD DEL PLOMO

Altas concentraciones de plomo que son tóxicas algunas veces provienen de la actividad humana como extraer y fundir adhesivos, de utensilios hechos de peltre (aleación de plomo), soldadura de plomo, cerámica, plomo-vidrioso y ventanas de cristal de colores, de tubos de plomo e instalación de cañerías, de descomponer pinturas basadas en plomo, y donde hay automóviles que usan gasolinas con aditivos de plomo. A pesar de sus numerosas aplicaciones beneficiosas, el plomo se define como un peligro a la salud humana en concentraciones relativamente pequeñas dentro del cuerpo, que se pueden adquirir por ingestión de alimento y agua o inhalando partículas aerotransportadas (Sánchez, 1999).

El cuerpo humano contiene aproximadamente 120 mg de plomo. Alrededor del 10-20% del plomo es absorbido por los intestinos. Los síntomas de la exposición al plomo incluyen cólicos, pigmentación de la piel y parálisis. Generalmente los efectos del envenenamiento por plomo son neurológicos o teratógenos. El plomo orgánico causa necrosis de neuronas. El plomo inorgánico crea degeneración axónica. Ambas especies de plomo causan edema cerebral y congestión. Los compuestos orgánicos del plomo se absorben rápidamente y por lo tanto suponen un mayor riesgo. Los compuestos orgánicos del plomo pueden ser cancerígenos. Las mujeres son generalmente más susceptibles al envenenamiento que los hombres. El plomo causa alteraciones menstruales, infertilidad y aumenta el riesgo de aborto. Los fetos son más susceptibles al envenenamiento por plomo que las madres, e incluso los fetos protegen a la madre del envenenamiento por plomo. Los niños absorben mayores cantidades de plomo por unidad de masa corporal que los adultos (hasta un 40%). Por lo tanto los niños son

generalmente más susceptibles al envenenamiento por plomo que los adultos. Los síntomas incluyen: cambios de comportamiento y desorden en la concentración. El plomo se acumula en los tejidos, el tipo más severo de envenenamiento causa encefalopatía. La toxicidad del plomo tiene lugar cuando los iones de plomo reaccionan con grupos tiol en proteínas, como enzimas, y éstas se quedan activadas. Además el plomo puede interaccionar con otros iones metálicos. (Newtenberg, 2010)

El plomo y los compuestos de plomo son generalmente contaminantes tóxicos. Las sales de plomo II y los compuestos orgánicos del plomo son dañinos desde un punto de vista toxicológico. Las sales de plomo son muy peligrosas en el agua, y por lo tanto dañinas para la salud. Así mismo son peligrosos los compuestos como el acetato de plomo, óxido de plomo, nitrato de plomo y carbonato de plomo. El plomo limita la síntesis clorofílica de las plantas, disminuye la actividad de las enzimas y disminuye el transporte mitocondrial de los electrones. No obstante las plantas pueden absorber del suelo altos niveles de plomo, hasta 500 ppm. El plomo es considerado tóxico para las plantas en concentraciones de 30-300 µg/g en sus tejidos. Consecuentemente, la aplicación de pesticidas de plomo está prohibida en la mayor parte de los países. El plomo se acumula en los organismos, en los sedimentos y en el fango. El plomo en el agua residual proviene principalmente de los tejados y de las calles. (Lenntech, 2009)

Se han realizado varios estudios para comprobar la toxicidad de los metales pesados en plantas, uno de tantos fue Khosravi y colaboradores en 2005, quienes demostraron la toxicidad de plomo, cadmio, niquel y zinc, utilizando *Azolla filiculoides* como indicador, los resultados señalaron claramente que dichos metales causan una inhibición del crecimiento de la planta, así como cambios en sus características físicas.

## 7.3 FUENTES GENERADORAS DE PLOMO

La galena (sulfuro de plomo) es el mineral dominante de plomo. El uso más amplio de plomo, como tal, se encuentra en la fabricación de acumuladores. Otras aplicaciones importantes son la fabricación de tetraetilo de plomo, forros para cables, elementos de construcción, pigmentos, soldadura suave, municiones, plomadas para pesca y también en la fabricación de juguetes. El plomo tiene un amplio uso en la construcción, en particular en la industria química ya que es resistente al ataque por parte de muchos ácidos porque forma su propio revestimiento protector de óxido. Sin embargo, es atacado por las bases nitrogenadas, como consecuencia de esta característica ventajosa, el plomo se utiliza mucho en la fabricación y el manejo del ácido sulfúrico, ácido nítrico, ciertos elementos halógenos y el vapor de azufre. Además, durante mucho tiempo, el plomo se ha empleado como pantalla protectora para las máquinas de rayos X (Aguilar, 2003).

Se ha vuelto también importante las aplicaciones del plomo como blindaje contra la radiación. Su utilización como cubierta para cables, ya sea la de teléfono, de internet o de electricidad, sigue siendo una forma de empleo. La ductilidad única del plomo lo hace particularmente apropiado para esta aplicación, porque puede estirarse para formar un forro continuo alrededor de los conductores internos. Las fuentes de exposición al plomo han cambiado en los años recientes, con la declinación de la gasolina plomada y de la soldadura del plomo en latas de alimentos (Jacobs, 1996).

## 7.4 PLOMO EN EL ECUADOR

La mayor incidencia de plomo en aguas ecuatorianas se da en regiones donde se encuentran industrias mineras, como es el caso de las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe. Los ríos de estas regiones presentan altas cantidades de plomo,

debido principalmente a que las industrias mineras depositan las colas de cianuración en las micro cuencas de dichas regiones (Garzón, 2006).

Por ello, para comprobar la contaminación se han realizado estudios en alimentos vegetales y animales como, peces de consumo humano (colectados en la parte baja de la cuenca hidrográfica), productos de origen vegetal que se cultivan cerca de los ríos y leche de cabra que existen en la parte baja de la cuenca. (Véase tabla 3 y 4).

**Tabla 3. Plomo en muestras de frutas y verduras, cuenca del Puyango 2001.**

| Cuenca | Lugar de Muestreo | Producto N. Común | Producto N. Científico | Pb mg/kg |
|---|---|---|---|---|
| Alta | 18 de Septiembre | Banano | *Musa spp.* | <ld |
| | El Osorio | Mango | *Anacardium sp.* | <ld |
| | Malvas | Café | *Coffea arabiga* | 8.70 |
| | | Café | *Coffea arabiga* | <ld |
| | Río Amarillo | Maíz | *Zea mais* | <ld |
| | | Mango | *Anacardium sp.* | <ld |
| | | Mango | *Anacardiun sp.* | <ld |
| | | Maní | *Arachis hypogea* | <ld |
| | | Papaya | *Carica papaya* | <ld |
| | | Plátano verde | *Musa spp.* | <ld |
| | | Yuca | *Manihot sp.* | <ld |
| Baja | Gramadales | Cebolla | *Alium cepa* | <ld |
| | | Pimiento | *Capsicum spp.* | <ld |
| | | Tomate | *Lycopersicum sp.* | <ld |
| | | Zapallo | *Cucurbita pepo* | <ld |
| | La Vega | Banano | *Musa spp.* | <ld |
| | | Cebolla | *Alium cepa* | <ld |
| | | Mango | *Anacardium sp.* | <ld |
| | | Papaya | *Carica papaya* | <ld |
| | | Sandía | *Citrullus vulgaris* | <ld |
| | | Zapallo | *Cucurbita pepo* | <ld |

**Fuente:** Garzón, 2006

**Tabla 4. Plomo detectado en peces, camarón y leche de cabra, cuenca del Puyango 2001.**

| Cuenca | Lugar de muestreo | Nombre Común | Nombre Científico | Submstr. | Pb mg/kg |
|---|---|---|---|---|---|
| Baja | Río Puyango | Pez vieja | *Aequidens sp.* | c. entero | 122.00 |
| | | Pez blanco | *Brycon coxeyi* | c. entero | 5.00 |
| | | Pez blanco | *Brycon coxeyi* | músculo | 3.80 |
| | | Pez life | *Rhemdia sp.* | músculo | <ld |
| | | Pez lisa | *Mugil curema* | músculo | <ld |
| | | | | hígado | 4.30 |
| | | Pez sábalo sp1 | *Brycon sp.* | músculo | 2.50 |
| | | | | hígado | 9.62 |
| | | Pez sábalo sp2 | *Prochilodus sp.* | músculo | <ld |
| | | | | hígado | <ld |
| | | Pez amarillo | *Aequidens sp.* | músculo | <ld |
| | | Pez corvina | *Geophagus sp.* | c. entero | <ld |
| | | Camarón | *Macrobrachium sp.* | c. entero | <ld |
| | Gramadales | Leche de cabra | - | - | <ld |
| | | Leche de cabra | - | - | <ld |

**Fuente:** Garzón, 2006.

El plomo también fue encontrado en lagos, tal es el caso del lago Yahuarcocha en la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura, en donde se realizaron estudios que demostraron que la contaminación por combustible dejó rastros de mercurio y plomo en las aguas (Herrera, 2003).

# 8. CADMIO

## 8.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS

Elemento químico relativamente raro, símbolo Cd, número atómico 48; tiene relación estrecha con el zinc, con el que se encuentra asociado en la naturaleza. Es un metal dúctil, de color blanco argentino con un ligero matiz azulado. Es más blando y maleable que el zinc, pero poco más duro que el estaño. Peso atómico de 112.40 y densidad relativa de 8.65 a 20ºC (68ºF). Su punto de fusión de 320.9ºC (610ºF) y de ebullición de 765ºC (1410ºF) son inferiores a los del zinc. Hay ocho isótopos estables en la naturaleza y se han descrito once radioisótopos inestables de tipo artificial. El cadmio es miembro del grupo IIB (zinc, cadmio y mercurio) en la tabla periódica, y presenta propiedades químicas intermedias entre las del zinc metálico en soluciones ácidas de sulfato. El cadmio es divalente en todos sus compuestos estables y su ion es incoloro. (Cavallaro, 2003).

## 8.2 TOXICIDAD DEL CADMIO

El cadmio es un metal pesado que produce efectos tóxicos en los organismos vivos, aún en concentraciones muy pequeñas. La exposición al cadmio en los humanos se produce generalmente a través de dos fuentes principales: la primera es la vía oral (por agua e ingestión de alimentos contaminados.) La segunda vía es por inhalación. La población fumadora es la más expuesta al cadmio, porque los cigarrillos lo contienen. Algunos órganos vitales son blancos de la toxicidad del cadmio. En organismos sobreexpuestos, el cadmio ocasiona graves enfermedades al actuar sobre dichos órganos. Sin embargo, la implicación real que este elemento tiene como agente tóxico ha sido poco estudiada, por

lo que se considera que debe ser monitoreado. Es de gran importancia llevar a cabo estudios para profundizar en los factores de riesgo y así aplicar medidas preventivas en la población. El cadmio es un elemento que se encuentra de manera natural en la corteza terrestre. El cadmio puro es un metal blando, de un brillo muy parecido al de la plata, pero en esta forma no es muy común encontrarlo en el ambiente. Este metal se encuentra más a menudo combinado con otros elementos (tales como oxígeno, cloro o azufre) formando compuestos (Rodriguez y Sandalio, 2008). Una gran parte del cadmio utilizado con fines industriales es obtenido como un producto a partir de la fundición de rocas que contienen zinc, plomo o cobre. El cadmio tiene muchas aplicaciones en la industria, pero es utilizado con más frecuencia en la elaboración de pigmentos, pilas eléctricas y plásticos. Pequeñas cantidades de cadmio se encuentran naturalmente en el aire, en el agua, en el suelo y en la comida. Para muchas personas, la comida es la principal causa de exposición al cadmio, debido a que muchos alimentos tienden a absorberlo y a retenerlo. Por ejemplo, las plantas toman el cadmio del suelo, los peces lo toman del agua, etc. (Godt y col, 2006).

La aplicación de ciertos fertilizantes o de excremento de animales en el suelo destinado al cultivo de alimentos puede aumentar su nivel de cadmio lo cual, a su vez, causa un aumento en el nivel de cadmio de los productos. El cadmio no se encuentra en cantidades preocupantes en el agua; sin embargo, puede contaminarla cuando ésta viaja a través de las tuberías (que muchas veces están soldadas con materiales que lo contienen) o cuando entra en contacto con desechos químicos. La fuente más importante de descarga de cadmio al medio ambiente es la quema de combustibles fósiles (como carbón o petróleo) o la incineración de la basura doméstica común. El cadmio también contamina el aire cuando se funden rocas para extraer zinc, cobre o plomo. Trabajar o vivir cerca de una de estas fuentes contaminantes puede resultar en una sobreexposición al cadmio. Fumar es otra importante fuente de cadmio. Como muchas plantas, el tabaco contiene cadmio, algo del cual es inhalado en el humo. Muchos fumadores tienen alrededor del doble de cadmio en sus organismos que los no fumadores (Romero, 2004).

El cadmio entra al torrente sanguíneo por absorción en el estómago o en los intestinos luego de la ingestión de comida o agua, o por absorción en los pulmones después de la

inhalación. Muy poco cadmio entra al cuerpo a través de la piel. Usualmente sólo es absorbido por la sangre alrededor del 1 al 5% del cadmio que es ingerido por la boca, mientras que se absorbe alrededor del 30 al 50% del que es inhalado. Un fumador que consuma un paquete de cigarros por día puede absorber, durante ese lapso, casi el doble del cadmio absorbido por un no fumador. De cualquier forma, una vez que el cadmio se absorbe es fuertemente retenido; así que incluso bajas dosis de este metal pueden constituir un nivel significativo en el organismo si la exposición se prolonga durante un largo periodo. Una vez absorbido el cadmio, es transportado por el torrente circulatorio hasta el hígado, en donde se une a una proteína de bajo peso molecular. Pequeñas cantidades de ese complejo proteína-cadmio pasan continuamente del hígado al torrente sanguíneo, para ser transportado a los riñones y filtrado a través de los glomérulos, para posteriormente ser reabsorbido y almacenado en las células tubulares del riñón. Este último órgano excreta del 1 al 2% del cadmio tomado directamente de las fuentes ambientales, lo que provoca una gran acumulación de cadmio en los riñones. La concentración del metal en el riñón es aproximadamente 10 mil veces más alta que en el torrente sanguíneo. La excreción fecal del metal representa una mínima cantidad de cadmio no absorbido en el sistema gastrointestinal. Por otra parte, se estima que la vida biológica del cadmio en los humanos varía entre 13 y 40 años (Cabaleiro y Lafuente, 2008).

No se sabe que el cadmio tenga algún efecto benéfico. Más bien puede causar algunos efectos adversos en la salud. Aunque las exposiciones prolongadas son extremadamente raras actualmente, la ingestión de altas dosis es causa de severas irritaciones del estómago, vómito y diarrea y su inhalación causa graves irritaciones en los pulmones. Causan mayor preocupación los efectos de las exposiciones bajas al cadmio y a largo plazo. En personas que han estado expuestas a un exceso de cadmio en su dieta o por el aire se ha observado un daño en los riñones. Esta enfermedad renal normalmente no es mortal, pero puede ocasionar la formación de cálculos y sus efectos en el sistema óseo se manifiestan a través de dolor y debilidad. En trabajadores de fábricas, en donde el nivel de concentración de cadmio en el aire es alto, han sido observados severos daños en los pulmones, tales como enfisema. En animales expuestos durante largos periódos al cadmio por inhalación, se ha observado la aparición de cáncer de pulmón. Estudios en

seres humanos también sugieren que una inhalación prolongada de cadmio puede resultar en incrementar el riesgo de contraer cáncer pulmonar, como en el caso de los fumadores. No hay evidencia de que la ingestión de cadmio por la vía oral sea causante de cáncer. Otros tejidos también son dañados por exposición al cadmio (en animales o humanos) incluyendo al hígado, los testículos, el sistema inmunológico, el sistema nervioso y la sangre. Efectos en la reproducción y el desarrollo han sido observados en animales expuestos al cadmio, pero no han sido reportados aún en seres humanos. (Gieco y Mata, 2009).

## 8.3 FUENTES GENERADORAS DE CADMIO

a) Fuentes naturales: El cadmio es un elemento que forma parte de la corteza terrestre, como un metal blando y de un brillo parecido al de la plata, pero en esta forma no es muy común hallarlo en el ambiente. Se ve más a menudo combinado con otros elementos formando compuestos sólidos, estables, que no se evaporan y que pueden encontrarse en el material particulado. Puede encontrarse asociado a compuestos de cinc, como la esfalerita (ZnS) minerales propios son la blenda de cadmio (CdS), la otavita ($CdCO_3$), la monteponita (CdO) representa el 1,5 x $10^{-5}$ % en peso de la corteza terrestre. La actividad volcánica es la mayor fuente natural de eliminación de cadmio a la atmósfera.

b) Fuentes antrópicas: Galvanotecnia, como catalizador (hidrogenación y síntesis de metano), en la fabricación de esmaltes y en sintetización: se usa óxido de cadmio. Fabricación de electrodos negativos de baterías de Níquel-cadmio, pilas y galvanotecnia: se usa Hidróxido de cadmio. Fotografía, tintorería y absorbente de $H_2S$: se usa cloruro de cadmio. Como pigmento amarillo, en pinturas y vidrio: se usa sulfuro de cadmio (Padilla, 2006).

Se emplea en la mejora de la estabilidad de los materiales de PVC frente a la luz y los agentes atmosféricos: se usa estearato de cadmio. Silicatos y boratos de cadmio

presentan fosforescencia y fluorescencia, y se usan como componentes de las sustancias fosforescentes de televisores blanco y negro y activadores para producir color azul y verde de tubos de TV color. Para el recubrimiento de cobre, hierro y acero por sus propiedades anticorrosivas. En aleaciones con cobre, níquel, oro, plata, bismuto y aluminio forma compuestos de fácil fusión, puede usarse como recubrimiento de otros materiales. Soldadura de cañerías. En el tabaco de los cigarrillos. Quema de combustibles fósiles, como el carbón o el petróleo, y la incineración de la basura común. En los fertilizantes de fosfatos o en los excrementos de animales aplicados al cultivo de alimentos. Casi todos los alimentos contienen cadmio, pero puede ser en menor o mayor concentración, sobre todo aquellos que fueron contaminados: carnes y pescados, animales de abasto, crustáceos y moluscos, lácteos y huevos, champiñones. (Alzogaray, 2009)

## 8.4 CADMIO EN EL ECUADOR

El río Guayas (Daule-Babahoyo), constituye la principal fuente de introducción de contaminantes en el Golfo de Guayaquil, introduce una cantidad equivalente al 75% de todas las descargas domésticas e industriales que se realizan en el litoral. Igualmente el río Teatone recibe cerca de 3 millones de metros cúbicos por año de efluentes de la actividad petroquímica, ubicada cerca de la ciudad de Esmeraldas, también el río Esmeraldas, capta desechos domésticos e industriales y del cultivo del camarón y en la región sierra, el rio Machángara de la ciudad de Quito. Todos estos ríos reciben descargas de cadmio por encima del límite permitido (véase tabla 5), siendo estos una fuente importante de contaminación y peligro para la salud humana, animal y ambiental (Escobar, 2002).

**Tabla 5. Límites máximos permisibles para plomo y cadmio en Ecuador**

| Tipo | Parámetros | Expresado como | Unidad | Límite máximo permisible |
|---|---|---|---|---|
| Aguas de consumo humano y uso doméstico, que únicamente requieren tratamiento convencional | Cadmio<br>Plomo | Cd<br>Pb | mg/l<br>mg/l | 0,01<br>0,05 |
| Aguas de consumo humano y uso doméstico que únicamente requieran desinfección | Cadmio<br>Plomo | Cd<br>Pb | mg/l<br>mg/l | 0,001<br>0,05 |
| Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en aguas dulces, frías o cálidas, y en aguas marinas y de estuario | Cadmio<br><br><br><br><br><br>Plomo | Cd<br><br><br><br><br><br>Pb | mg/l<br><br><br><br><br><br>mg/l | Agua fría dulce (0,001)<br>Agua cálida dulce (0,001)<br>Agua marina y de estuario (0,005)<br><br>Agua marina y de estuario (0,01) |
| Criterios referenciales de calidad para aguas subterráneas, considerando un suelo con contenido de arcilla entre (0-25,0) % y de Materia orgánica entre (0 - 10,0) %. | Cadmio<br>Plomo | Cd<br>Pb | mg/l<br>mg/l | 3,2<br>45 |
| Criterios de calidad admisibles para aguas de uso agrícola | Cadmio<br>Plomo | Cd<br>Pb | mg/l<br>mg/l | 0,01<br>0,05 |
| Criterios de calidad para aguas de uso pecuario | Cadmio<br>Plomo | Cd<br>Pb | mg/l<br>mg/l | 0,05<br>0,05 |
| Límites de descarga al sistema de alcantarillado público | Cadmio<br>Plomo | Cd<br>Pb | mg/l<br>mg/l | 0,02<br>0,5 |
| Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce | Cadmio<br>Plomo | Cd<br>Pb | mg/l<br>mg/l | 0,02<br>0,2 |
| Límites de descarga a un cuerpo de agua marina | Cadmio<br>Plomo | Cd<br>Pb | mg/l<br>mg/l | 0,2<br>0,5 |

**Fuente**: Ministerio del Ambiente, Decreto Ejecutivo No. 3516 publicado en la Edición Especial No. 2 del Registro Oficial del 31 de Marzo de 2009.

# METODOLOGÍA

## 1. CRECIMIENTO, ESTABILIZACIÓN Y DESARROLLO DE *Azolla caroliniana* EN UN MEDIO CON CONDICIONES CONTROLADAS, RICO EN NUTRIENTES Y METALES PESADOS.

### 1.1 RECOLECCIÓN DE *Azolla caroliniana*

Se realizó la recolección del helecho en la provincia de Pichincha, cantón Quito, en la parroquia de Pifo Km 6 vía intervalles, en el huerto Arellanos, tal como se aprecia en el gráfico 3.

La biomasa de *A. caroliniana* que sirvió de inóculo para los experimentos fue cosechada después de 7 días de cultivo.

Finalmente se colocó el helecho en bolsas de plástico con agujeros para su aireación y se procedió a trasladarla al laboratorio CIVABI, perteneciente a la Universidad Politécnica Salesiana, en el sector El Girón, en la ciudad de Quito.

**Gráfico 3. Recolección de Azolla en huerto Arellanos, Pifo-Ecuador**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

## 1.2 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *A.caroliniana*

Primero se tomó 20 gramos de helecho fresco y se colocó en papel reciclado doblado, éste fue llevado a una estufa a 50ºC durante 2 días. Luego de ello, se llevó la muestra al Herbario Nacional, ubicado en la Av. Río Coca en la ciudad de Quito, donde se realizó la identificación botánica respectiva.

## 1.3 ACONDICIONAMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO PARA *Azolla caroliniana*

### 1.3.1 UNIDADES EXPERIMENTALES

Para el experimento en sistemas con plomo y cadmio, las unidades experimentales fueron cristalizadores de vidrio (20 cm de diámetro x 10 cm de alto) conteniendo 1,5 litros de medio. Se montaron 9 unidades experimentales para los diferentes tratamientos. Como control se utilizó una unidad experimental conteniendo solamente agua con plomo y cadmio, para poder cuantificar la posible cantidad de metales acumulados en la planta sin utilizar medio nutritivo. Los cristalizadores fueron abastecidos continuamente de aire a través de una bomba de doble salida marca Cole-Palmer (véase gráfico 4).

**Grafico 4. Bomba de aire de doble salida marca Cole-Palmer**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

### 1.3.2 SUSTRATO

Para el experimento se utilizó contenedores de cristal con capacidad de 1,5 litros conteniendo 3,75 mL de Nutriente Mayor "Nutripon" con 1,5 ml de Nutriente menor "Nutripon" ambos de la casa ANNQUIMICA (véase gráfico 5 y tabla 6), diluido hasta su aforo con agua de llave.

**Grafico 5. Nutriente hidropónico "NUTRIPON"**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

**Tabla 6. Composición del nutriente hidropónico Nutripon**

| ***NUTRIENTE MAYOR*** | | ***NUTRIENTE MENOR*** | |
|---|---|---|---|
| **Composición** | **g/L** | **Composición** | **g/L** |
| Nitrógeno Total | 107,4 | Hierro quelatado | 2,2 |
| Nitrógeno nítrico | 95,6 | Magnesio | 20,4 |
| Nitrógeno amoniacal | 11,8 | Azufre | 27,6 |
| Fósforo asimilable ($P_2O_5$) | 41,5 | Manganeso | 0,22 |
| Potasio soluble ($K_2O$) | 98,0 | Boro | 0,22 |
| Calcio (CaO) | 102,0 | Cobre | 0,024 |
| | | Zinc | 0,104 |
| | | Molibdeno | 0,0005 |
| | | Cobalto | 0,00022 |

**Fuente:** AnnQuímica, 2010

### 1.3.3 CONDICIONES AMBIENTALES

La biomasa creció bajo condiciones controladas de temperatura, pH, humedad e intensidad luminosa, así:

* Un fotoperiódo de 18 horas de luz con 6 horas de oscuridad

* Una temperatura de aire de aproximadamente 20ºC

* Una humedad relativa del 60 % aproximadamente

* Conductividad del agua entre 125 siemens y 600 siemens aproximadamente.

* Aireación constante

* Un pH que osciló entre 3 y 7.

## 1.4 AJUSTE DE CONTAMINANTES

Se utilizó diferentes concentraciones de metales pesados: 1, 2, 3 y 4 ppm de plomo y cadmio. El Pb y Cd utilizados fueron introducidos en el medio de cultivo en forma de sales:

- Acetato de Plomo [$Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3H_2O$]
- Acetato de Cadmio [$(CH_3COO)_2Cd \cdot 2H_2O$]

Tratamiento Control: 2 ppm Pb + 2 ppm Cd

Tratamiento 1: 1 ppm Cd

Tratamiento 2: 1 ppm Pb

Tratamiento 3: 2 ppm Cd

Tratamiento 4: 2 ppm Pb

Tratamiento 5: 3 ppm Cd

Tratamiento 6: 3 ppm Pb

Tratamiento 7: 4 ppm Cd

Tratamiento 8: 4 ppm Pb

Tratamiento 9: 2 ppm Cd + 2 ppm Pb

## 1.5 CARACTERÍSTICAS DE BIOMASA DE *A. caroliniana*

La biomasa se sacó del medio anterior donde creció, se colocó en una coladera y estuvo bajo la corriente de agua de la llave durante 5 minutos. A cada unidad experimental se le colocaron 60 gramos de inóculo de *A. caroliniana*, que corresponde a 128,55 $g/m^2$ de biomasa para el inoculo lavado.

Al final, con la ayuda de una guía para reconocimiento de daño en frondas de *Azolla caroliniana* (véase anexo 1), se tomó fotografías de los diferentes tratamientos para ver el daño causado en las hojas del helecho por parte de los metales pesados a los que estuvo expuesta después del tiempo de contacto.

## 1.6 MONITOREO

* Al inicio del experimento, es decir antes de adicionar la planta al medio con metales, se tomaron las muestras correspondientes al tiempo cero (duplicados de 20 ml de medio).

* Se determinó la temperatura, humedad, pH y conductividad pasando un día de cada unidad experimental.

* Diariamente se revisó el estado de los timers para controlar la cantidad de luz y humedad en el microclima.

* La concentración de plomo y cadmio en el medio se determinó con duplicados de 20 ml al inicio y final de tiempo de contacto (2 semanas).

* Al inicio y al final de cada experimento se tomaron fotografías de la biomasa de *A. caroliniana* para observar los posibles cambios de la apariencia de la biomasa (frondas y raíces).

# 2. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLOMO Y CADMIO ABSORBIDA POR EL HELECHO *Azolla caroliniana*.

## 2.1 TRATAMIENTO PRELIMINAR DEL MATERIAL VEGETAL

Una vez pasado el tiempo de contacto de dos semanas de la *Azolla caroliniana* con el medio de cultivo, se procedió a sacar el helecho del medio y se lo colocó en un embudo con papel filtro de poro medio doblado por la mitad durante 15 minutos para absorber el exceso de medio.

Posteriormente se pesó el material vegetal para obtener el peso fresco total, y luego se colocó al helecho en cajas petri, que fueron llevadas a una estufa a 60ºC durante 3 días hasta su secado.

Finalmente se procedió a triturar al helecho con la ayuda de un mortero de cerámica, hasta lograr el mínimo tamaño de partícula, y se colocó el polvo de helecho en tubos de ensayo con tapa rosca correctamente etiquetados. Igualmente se tomó muestras del medio resultante de cada unidad experimental.

Esto se puede apreciar en los gráficos 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

**Gráfico 6. Absorción del exceso de medio de cultivo a través de un embudo**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

**Gráfico 7. Biomasa de *A. caroliniana* fresca en cajas petri**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

**Gráfico 8. Biomasa de *A. caroliniana* en estufa a 60ºc**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

**Gráfico 9. Trituración de la biomasa de *A. caroliniana* en mortero de cerámica**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

**Gráfico 10. Muestra triturada de *A. caroliniana* en tubos de ensayo**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

**Gráfico 11. Muestra del medio de cultivo en frasco ámbar**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

## 2.2 DIGESTIÓN ÁCIDA EN BIOMASA

Se pesó 300 mg de la planta seca en un vaso de digestión dentro de una balanza analítica marca METTLER TOLEDO (véase gráfico 12), luego dentro del flujo laminar del laboratorio, se añadió 5 ml de ácido nítrico al 67 %, se mezcló y se dejó reposar por 15 minutos aproximadamente (véase gráfico 13).

A continuación se introdujeron los vasos en un digestor microondas marca BERGHOF modelo MWS-2 (véase anexo 2), y se procedió a realizar la digestión con un método modificado de BERGHOF (anexo 3) para planta seca indicado en la tabla 7.

**Gráfico 12. Pesaje de biomasa en balanza analítica**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

**Gráfico 13. Adición de ácido nítrico a la muestra de *A. caroliniana***

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

**Tabla 7. Método modificado de digestión ácida para plantas secas**

| | **Temperatura (ºC)** | **Rampa (min)** | **Tiempo (min)** | **Poder (%)** |
|---|---|---|---|---|
| **Paso 1** | 145 | 11 | 5 | 90 |
| **Paso 2** | 190 | 5 | 10 | 90 |
| **Paso 3** | 100 | 1 | 10 | 90 |

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

Finalmente, una vez enfriados los vasos de digestión se pasó el contenido en filtros millipore (véase gráfico 14) y se vertió en un balón de cristal con tapa para su aforo a 100 ml con agua destilada.

**Gráfico 14. Filtración en millipore de la muestra digerida de *A. caroliniana***

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

## 2.3 DIGESTIÓN ACIDA EN AGUA RESIDUAL (MEDIO DE CULTIVO)

Se tomó 30 ml de la muestra en un vaso de digestión con la ayuda de una probeta (véase gráfico 15), luego dentro del flujo laminar del laboratorio se añadió 5 ml de ácido nítrico al 67 %, y 6 ml de agua oxigenada al 10 %, luego se mezcló y se dejó reposar por 15 minutos aproximadamente. A continuación se introdujeron los vasos en un digestor

microondas marca BERGHOF modelo MWS-2 (véase anexo 2), y se procedió a realizar la digestión con un método modificado de BERGHOF (anexo 4) para efluentes con metales pesados indicado en la tabla 8.

**Gráfico 15. Medición del agua residual con la ayuda de una probeta**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

**Tabla 8. Método modificado de digestión acida para efluentes con metales pesados**

| | **Temperatura (ºC)** | **Rampa (min)** | **Tiempo (min)** | **Poder (%)** |
|---|---|---|---|---|
| **Paso 1** | 160 | 10 | 5 | 80 |
| **Paso 2** | 200 | 5 | 5 | 80 |
| **Paso 3** | 100 | 1 | 10 | 80 |

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

Finalmente, una vez enfriados los vasos de digestión se vertió el contenido en frascos de cristal con tapa (véase gráfico 16).

**Gráfico 16. Vertido de la muestra digerida en frasco de cristal**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

## 2.4 DETERMINACIÓN DE PLOMO Y CADMIO EN MUESTRA VEGETAL Y EN MEDIO DE CULTIVO

El análisis y cuantificación de Pb y Cd se realizó por un método espectrofotométrico, utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) de aspiración directa marca VARIAN (véase anexo 5), usando flama de aire-acetileno, lámpara de Pb; A=283,2 nm y lámpara de Cd; A=228,8 nm. El límite de detección del equipo fue de 0.1 ppm, y el límite de cuantificación 0.5 ppm.

* A partir de la solución Stock estandarizada se prepararon soluciones en un intervalo de concentraciones de 1 a 20 ppm.

* Se calibró el equipo con las soluciones preparadas, para obtener una curva de calibración con un coeficiente de regresión lineal $r^2$= 0,9996 o superior.

* Se procedió a realizar las lecturas primero del medio de cultivo y luego de la biomasa (véase gráficos 17 y 18).

* Asimismo, se leyeron regularmente (cada 15 muestras) los estándares, para confirmar la calibración y la estabilidad del equipo.

***** Todo el material a utilizarse se lavó como se indica a continuación:

a) Agua tibia durante 1 hora, posteriormente, se enjuagó con abundante agua destilada.

b) Se colocó el material en acido nítrico (solución al 10% en agua destilada) durante 12 horas.

c) Por último, se enjuagó nuevamente con agua destilada.

d) Se utilizó equipo de seguridad adecuado (mascarilla contra vapores y gases ácidos, guantes resistentes a ácido, gafas de protección) y se trabajó bajo la campana de extracción de humos.

**Gráfico 17. Lectura de los estándares para curva de calibración**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

**Gráfico 18. Lectura de muestras de biomasa y agua en absorción atómica**

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

## 2.5 FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN (FBC)

Se calculó el factor de Bioconcentración (FBC: medida de la capacidad de un compuesto para acumularse en un tejido después de su absorción desde el medio circundante; es la relación calculada o experimentalmente determinada, entre la concentración del compuesto en el organismo y la del medio circundante. Marcovecchio y Moreno, 1991) utilizando la siguiente fórmula:

$$\mathbf{FBC}=\frac{\text{CETT } (\frac{\text{mg}}{\text{kg}})}{\text{CPES } (\frac{\text{mg}}{\text{l}})} \qquad \textbf{(1)}$$

**Donde:**

**CETT:** Concentración del elemento traza en el tejido de la planta cosechada.

**CPES:** Concentración promedio del elemento en la solución.

## 2.6 PORCENTAJE DE REMOCIÓN

El porcentaje de remoción se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula**:**

$$\%\ \textbf{Remoción} = \frac{\boldsymbol{Ci-Cf}}{\boldsymbol{Ci}} * 100 \qquad \textbf{(2)}$$

**Donde:**

***Ci*=** Concentración inicial (mg/l) y ***Cf*=** Concentración final (mg/l)

# 3. ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO MÁS ADECUADO PARA LA COMPROBACIÓN DE LA FITORREMEDIACIÓN.

## 3.1 INTENSIDAD LUMINOSA

Para evaluar el efecto de la intensidad luminosa se procedió a probar el experimento con una concentración de 2 ppm para plomo y cadmio respectivamente, en 2 fases distintas:

**Fase 1 (Condición Controlada):** 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad.

**Fase 2 (Condición Normal):** 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

## 3.2 NUTRIENTE

Para evaluar el efecto del nutriente utilizado, se utilizo unidades experimentales llamadas "control" que no poseían nutriente alguno. En las demás unidades experimentales se introdujeron un nutriente llamado "NUTRIPON" de la casa química "ANNQUIMICA" dividido en dos partes: Nutriente mayor y nutriente menor.

## 3.3 HUMEDAD Y TEMPERATURA

Para evaluar el efecto de la humedad y temperatura se procedió a probar el experimento con una concentración de 2 ppm para plomo y cadmio respectivamente, en 2 fases distintas:

**Fase 1 (Condición Controlada):** Una humedad del 60-70 % con una temperatura de 20-25ºC aproximadamente, con la ayuda de un vaporizador marca "VAPORIZER", controlado con regulador de tiempo "timer", para que se encienda durante 6 horas al día.

**Fase 2 (Condición Normal):** Humedad de la ciudad de Quito. 40-50 % aproximadamente y una temperatura ambiente que oscila entre los 12 a 22ºC.

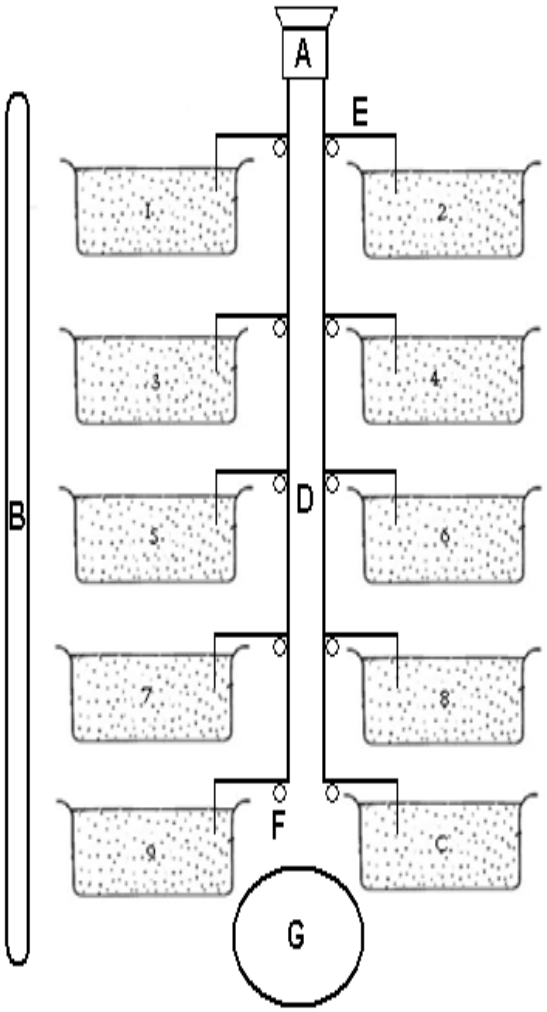
## 4. ANÁLISIS DE DATOS

Todos los resultados, fueron analizados usando pruebas de ANOVA y un posterior análisis de TUKEY. El análisis estadístico fue desarrollado usando el programa STATISTIX (versión 8.0) a un nivel de significancia $p<0.05$ y teniendo en cuenta los valores de F tabulados. (Véase anexo 6)

## 5. EXPERIMENTO CON *A. caroliniana* EXPUESTAS A MEDIO ENRIQUECIDO CON METALES PESADOS

Todo el experimento se realizó en un tiempo de contacto de 2 semanas.

**GRÁFICO 19. DIAGRAMA DEL EXPERIMENTO (Véase anexo 7)**




**1.** Biomasa de *A. caroliniana* en medio enriquecido + 1 ppm Cd
**2.** Biomasa de *A. caroliniana* en medio enriquecido + 1 ppm Pb
**3.** Biomasa de *A. caroliniana* en medio enriquecido + 2 ppm Cd
**4.** Biomasa de *A. caroliniana* en medio enriquecido + 2 ppm Pb
**5.** Biomasa de *A. caroliniana* en medio enriquecido + 3 ppm Cd
**6.** Biomasa de *A. caroliniana* en medio enriquecido + 3 ppm Pb
**7.** Biomasa de *A. caroliniana* en medio enriquecido + 4 ppm Cd
**8.** Biomasa de *A. caroliniana* en medio enriquecido + 4 ppm Pb
**9.** Biomasa de *A. caroliniana* en medio enriquecido + 2 ppm Cd y 2 ppm Pb
**C.** Biomasa de *A. caroliniana* sin medio enriquecido + 2 ppm Cd y 2 ppm Pb
**A.** Bomba de aire de 2 salidas
**B.** Lámpara fluorescente
**D.** Mangueras principales de aire
**E.** Mangueras secundarias de aire
**F.** Válvulas de regulación para entrada de aire
**G.** Vaporizador

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 1. CRECIMIENTO, ESTABILIZACIÓN Y DESARROLLO DE *Azolla caroliniana* EN UN MEDIO CON CONDICIONES CONTROLADAS, RICO EN NUTRIENTES Y METALES PESADOS.

### 1.1 RECOLECCIÓN DE *Azolla caroliniana*

Se recolecto 1 Kg de Azolla aproximadamente, en la provincia de Pichincha, cantón Quito, en la parroquia de Pifo Km 6 vía intervalles, en el huerto Arellanos. La biomasa de *A. caroliniana* que sirvió de inóculo para los experimentos fue cosechada después de 7 días de cultivo.

### *1.2* IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *A.caroliniana*

La identificación de la muestra llevada al "Herbario Nacional" fue la siguiente:

**Familia:** Salvinaceae, **Especie:** *Azolla caroliniana* Willd. (Véase anexo 8)

## 1.3 ACONDICIONAMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO PARA *A. caroliniana*

### 1.3.1 UNIDADES EXPERIMENTALES

Las unidades experimentales se ubicaron dentro de un microclima con condiciones controladas de luz, humedad, temperatura y aireación. (Véase anexo 10.2).

### 1.3.2 SUSTRATO

El nutriente utilizado resultó ser muy eficaz en el diseño experimental, ya que no existieron precipitaciones (Véase gráfico 20) ni con las sales metálicas ni con el material de los cristalizadores, comprobando así la correcta elección de las sales metálicas en forma de acetatos, ya que si se hubiese elegido los nitratos, estos podrían haber reaccionado con el potasio soluble del nutriente, produciendo un precipitado color amarillento-anaranjado claro (Gardner, 2009).

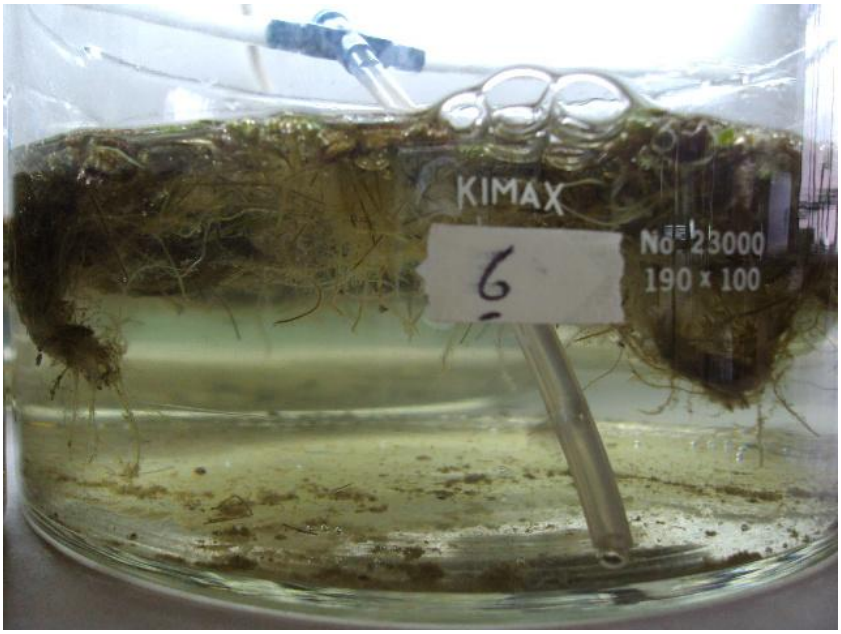
### 1.3.3 CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones estuvieron controladas en todo momento para asegurar el cumplimiento metodológico del proyecto. (Véase tablas 10, 11 y 12).

## 1.4 AJUSTE DE CONTAMINANTES

Los metales pesados (plomo y cadmio) introducidos en forma de sales (acetatos) no presentaron precipitación alguna como se muestra en el gráfico 20, ya sea con el nutriente utilizado ni con el cristal de las unidades experimentales.

**Gráfico 20. Solubilidad del nutriente y de las sales en el medio**




**Fuente:** Ballesteros, 2011.

## 1.5 CARACTERÍSTICAS DE BIOMASA DE *A. caroliniana*

Tomando como base el anexo 1, que se refiere a una guía para diferenciar daños en las frondas, se evidenció en la tabla 9, que *A. caroliniana* no presentó graves daños en sus frondas a pesar de estar expuesta a concentraciones elevadas de plomo por un periodo de 2 semanas, lo que indica que este helecho presenta alta eficiencia en sus mecanismos de tolerancia al plomo, no así el cadmio que resultó ser más dañino para la planta ya que se observó un cambio notable en su coloración normal, en especial en el tratamiento 7, lo que quiere decir que en una concentración de 4 ppm de cadmio, *A. caroliniana* sufre una alta mortalidad y su crecimiento disminuye significativamente con el tiempo.

**Tabla 9. Aspecto de la biomasa después del tiempo de contacto**

| **Tratamiento** | **Nutriente** | **Característica de las frondas** | **Imagen** |
|---|---|---|---|
| **C:** 2ppm Cd + 2ppm Pb | No | Cloróticas | |
| **1:** 1ppm Cd | Si | Muy dañadas | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **2:** 1ppm Pb | Si | Cloróticas | |
| **3:** 2ppm Cd | Si | Muy dañadas | |
| **4:** 2ppm Pb | Si | Cloróticas | |
| **5:** 3ppm Cd | Si | Muy dañadas | |
| **6:** 3ppm Pb | Si | Cloróticas | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **7:** 4ppm Cd | Si | Muy dañadas a muertas | |
| **8:** 4ppm Pb | Si | Cloróticas | |
| **9:** 2ppm Cd + 2ppm Pb | Si | Cloróticas | |

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

## 1.6 MONITOREO

**Tabla 10. Peso de la biomasa, nutriente y metales pesados introducidos**

| Tratamiento | Peso fresco (g) | Nutriente Mayor (mL) | Nutriente Menor (mL) | Plomo inicial (ppm) | Cadmio inicial (ppm) |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 60,5 | 3,75 | 1,5 | | 1 |
| **2** | 60,6 | 3,76 | 1,3 | 1 | |
| **3** | 60,4 | 3,74 | 1,6 | | 2 |
| **4** | 60,8 | 3,75 | 1,4 | 2 | |
| **5** | 60,7 | 3,75 | 1,6 | | 3 |
| **6** | 60,2 | 3,76 | 1,4 | 3 | |
| **7** | 60,4 | 3,76 | 1,5 | | 4 |
| **8** | 60,6 | 3,73 | 1,5 | 4 | |
| **9** | 60,6 | 3,75 | 1,6 | 2 | 2 |
| **C** | 60,6 | 3,75 | 1,5 | 2 | 2 |

**Fuente:** Ballesteros, 2011

El cuadro muestra los valores que se introdujeron en las unidades experimentales de peso fresco del helecho, nutriente y metales pesados al inicio del experimento.

**Tabla 11. Medición del ph en los diferentes tratamientos.**

| Tratamiento | Punto 1 | Punto 2 | Punto 3 | Punto 4 | Punto 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 3,7 | 4,3 | 5,5 | 6,4 | 6,7 |
| **2** | 3,8 | 4,7 | 5,8 | 6,5 | 6,7 |
| **3** | 3,8 | 4,7 | 5,9 | 6,7 | 6,9 |
| **4** | 3,8 | 4,6 | 5,9 | 6,7 | 7,1 |
| **5** | 3,6 | 4,6 | 6,0 | 6,7 | 6,8 |
| **6** | 3,7 | 4,4 | 5,7 | 6,5 | 6,6 |
| **7** | 3,9 | 4,8 | 6,1 | 6,8 | 6,9 |
| **8** | 3,8 | 4,7 | 6,0 | 6,8 | 7,0 |
| **9** | 3,8 | 4.5 | 6,0 | 6,8 | 6,9 |
| **C** | 7,2 | 7,3 | 7,6 | 7,7 | 7,7 |

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

A medida que iba avanzando los días, el pH aumentaba debido a que el helecho consumía el nutriente aplicado y además se producía la acumulación de metales pesados, por lo cual el medio enriquecido que en un principio era ácido, al final del tiempo de contacto se neutralizó.

**Tabla 12. Medición de temperatura y humedad en los puntos de monitoreo.**

| | Punto 1 | Punto 2 | Punto 3 | Punto 4 | Punto 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| **Temperatura (ºC)** | 20,1 | 19 | 19,1 | 20,6 | 21,4 |
| **Humedad (%)** | 53 | 55 | 54 | 57 | 58 |

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

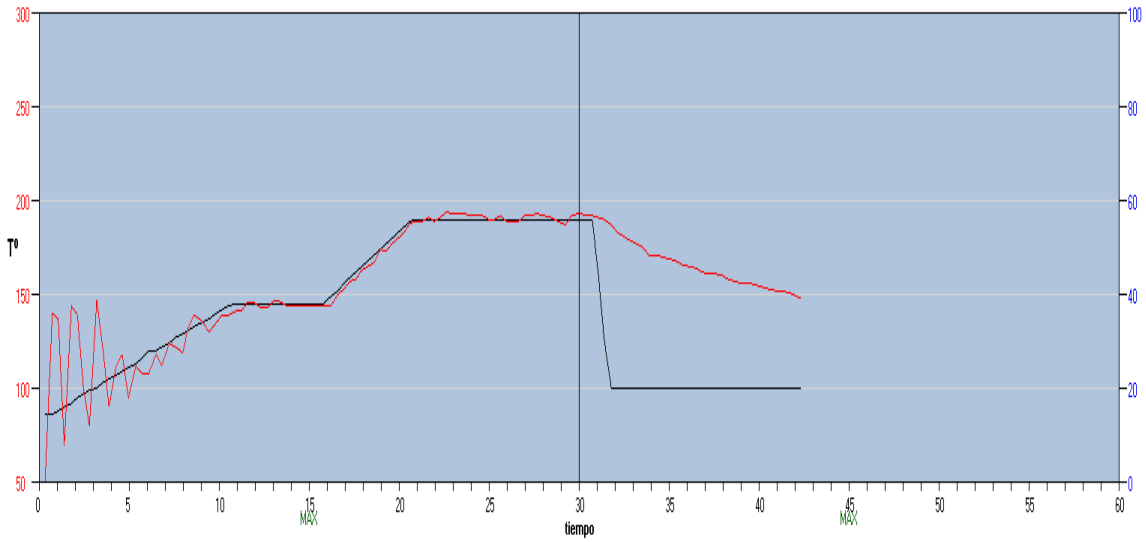
La temperatura se mantuvo dentro de los límites fijados, apenas varió 1,9 ºC aproximadamente, igual la humedad que tuvo una variación de 5%, lo cual nos indicó que el microclima creado fue eficiente.

## 2. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PLOMO Y CADMIO ABSORBIDA POR EL HELECHO *Azolla caroliniana*.

### 2.1 DIGESTIÓN ACIDA EN BIOMASA Y EN AGUA

Al final del proceso de digestión de la biomasa, se obtuvo una solución clara de color verde la cual fue filtrada al vacío para posteriormente ser leída por el espectrofotómetro de absorción atómica. Igualmente al final del proceso de digestión del agua, se obtuvo una solución clara la cual fue leída por el espectrofotómetro de absorción atómica.

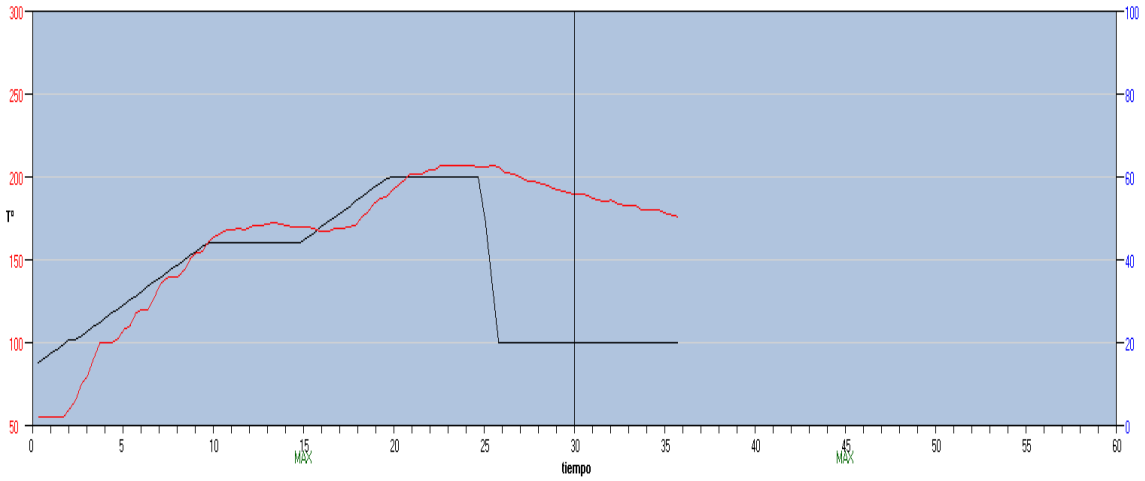
**Gráfico 21. Digestión acida de biomasa utilizando un método modificado de BERGHOF.**




**Fuente:** Ballesteros, 2011.

El gráfico temperatura vs tiempo muestra el proceso de digestión de la biomasa, la línea negra representa el método teórico establecido y la línea roja representa el proceso real que sucedió en la digestión.

**Gráfico 22. Digestión acida de agua final utilizando un método modificado de BERGHOF.**

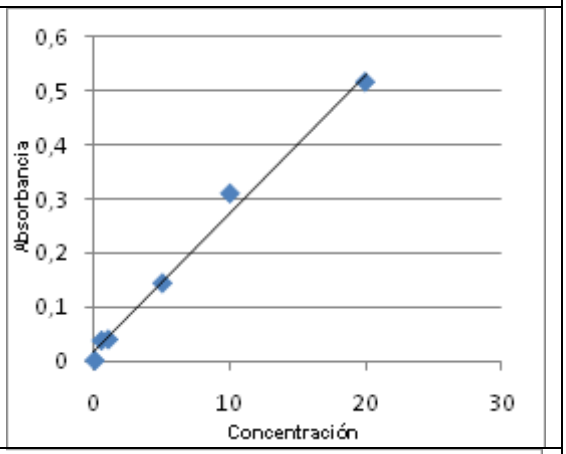
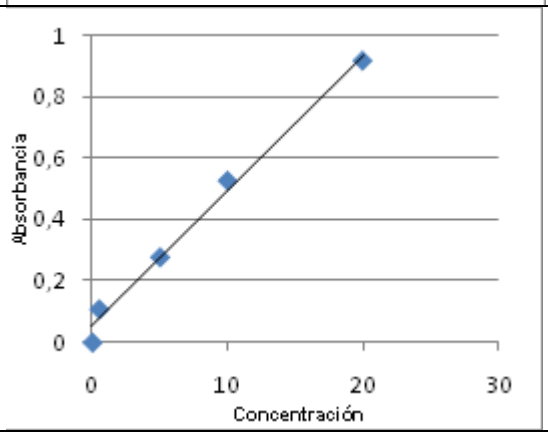



**Fuente:** Ballesteros, 2011.

El gráfico temperatura vs tiempo muestra el proceso de digestión del agua final, la línea negra representa el método teórico establecido y la línea roja representa el proceso real que sucedió en la digestión.

## 2.2 CURVA DE CALIBRACIÓN EN ESTÁNDARES DE PLOMO Y CADMIO

**Tabla 13. Curva de calibración en estándares de plomo y cadmio**

| Metal | Estándar (ppm) | Absorbancia | Regresión Lineal ($r^2$) | Gráfico |
|---|---|---|---|---|
| Pb | 0<br>0,5<br>1<br>5<br>10<br>20 | 0<br>0,037<br>0,039<br>0,143<br>0,309<br>0,515 | 0,9909 |  |
| Cd | 0<br>0,5<br>5<br>10<br>20 | 0<br>0,109<br>0,279<br>0,529<br>0,921 | 0,9901 |  |

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

La tabla muestra la correlación ("$r^2$") de las rectas que determinaron la calidad del ajuste de los estándares de plomo y cadmio en el equipo de absorción atómica. En este caso, el "$r^2$" resultante fue cercano a 1, por lo que el ajuste fue bueno y las predicciones realizadas a partir del modelo obtenido fueron muy fiables ya que el modelo resultó verdaderamente representativo.

## 2.3 ABSORBANCIA Y CONCENTRACIÓN DE PLOMO Y CADMIO EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

**Tabla 14. Concentración de plomo y cadmio en agua final**

| Muestra | Metal | Trat. | Concen. Inicial (ppm) | Concentración Final (ppm) | | | | Absorbancia | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 1º | 2º | 3º | Prom | 1º | 2º | 3º | Prom |
| Agua | Cd | C | 2 | 0,80 | 0,80 | 0,79 | 0,80 | 0,185 | 0,195 | 0,189 | 0,190 |
| | | 1 | 1 | 0,30 | 0,30 | 0,31 | 0,30 | 0,086 | 0,108 | 0,098 | 0,097 |
| | | 3 | 2 | 0,50 | 0,50 | 0,49 | 0,50 | 0,123 | 0,152 | 0,137 | 0,138 |
| | | 5 | 3 | 0,70 | 0,40 | 0,55 | 0,55 | 0,153 | 0,124 | 0,140 | 0,139 |
| | | 7 | 4 | 0,90 | 0,70 | 0,80 | 0,80 | 0,188 | 0,196 | 0,191 | 0,192 |
| | | 9 | 2 | 0,60 | 0,50 | 0,55 | 0,55 | 0,141 | 0,171 | 0,157 | 0,156 |
| Agua | Pb | C | 2 | 0,80 | 0,50 | 0,65 | 0,65 | 0,020 | 0,015 | 0,017 | 0,018 |
| | | 2 | 1 | 0,40 | 0,20 | 0,30 | 0,30 | 0,012 | 0,012 | 0,013 | 0,012 |
| | | 4 | 2 | 0,60 | 0,40 | 0,50 | 0,50 | 0,019 | 0,014 | 0,016 | 0,017 |
| | | 6 | 3 | 0,50 | 0,30 | 0,40 | 0,40 | 0,015 | 0,013 | 0,015 | 0,014 |
| | | 8 | 4 | 0,50 | 0,70 | 0,60 | 0,60 | 0,016 | 0,032 | 0,023 | 0,024 |
| | | 9 | 2 | 0,50 | 0,70 | 0,60 | 0,60 | 0,017 | 0,033 | 0,026 | 0,025 |

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

El cuadro indica la absorbancia y la concentración final en ppm de los metales pesados en el agua final después del tiempo de contacto en los diferentes tratamientos. Además para obtener datos representativos se realizó tres lecturas y se obtuvo un dato promedio.

Además, en el cuadro se puede observar que el agua después del tiempo de contacto, tuvo una concentración promedio de plomo de 0,4 ppm, alcanzando concentraciones que

se encuentran dentro de los límites permisibles para la descarga al sistema de alcantarillado público de acuerdo a la legislación vigente (Véase tabla 5), verificando así el proceso de hiperacumulación de este metal por parte de *Azolla caroliniana*.

**Tabla 15. Concentración de plomo y cadmio en biomasa**

| Muest | Metal | Trat | Peso seco (g) | Concentración Final (ppm) | | | | Absorbancia | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 1º | 2º | 3º | Prom | 1º | 2º | 3º | Prom |
| Planta | Cd | C | 1,7 | 1,30 | 1,10 | 1,20 | 1,20 | 0,188 | 0,221 | 0,204 | 0,205 |
| | | 1 | 1,9 | 0,60 | 0,60 | 0,60 | 0,60 | 0,148 | 0,175 | 0,163 | 0,162 |
| | | 3 | 1,9 | 1,50 | 1,30 | 1,40 | 1,40 | 0,277 | 0,319 | 0,299 | 0,298 |
| | | 5 | 1,9 | 2,80 | 2,10 | 2,45 | 2,45 | 0,392 | 0,424 | 0,407 | 0,408 |
| | | 7 | 2,1 | 3,50 | 3,10 | 3,30 | 3,30 | 0,436 | 0,521 | 0,480 | 0,479 |
| | | 9 | 1,8 | 1,70 | 1,40 | 1,55 | 1,55 | 0,299 | 0,343 | 0,320 | 0,321 |
| Planta | Pb | C | 1,7 | 1,50 | 1,30 | 1,40 | 1,40 | 0,051 | 0,051 | 0,052 | 0,051 |
| | | 2 | 2 | 0,80 | 0,60 | 0,70 | 0,70 | 0,025 | 0,027 | 0,026 | 0,026 |
| | | 4 | 2,1 | 1,90 | 1,50 | 1,70 | 1,70 | 0,062 | 0,084 | 0,72 | 0,073 |
| | | 6 | 2 | 2,70 | 2,50 | 2,60 | 2,60 | 0,092 | 0,101 | 0,097 | 0,096 |
| | | 8 | 2,1 | 3,50 | 3,30 | 3,40 | 3,40 | 0,118 | 0,123 | 0,120 | 0,121 |
| | | 9 | 1,8 | 1,40 | 1,20 | 1,30 | 1,30 | 0,048 | 0,050 | 0,049 | 0,049 |

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

El cuadro muestra la absorbancia y la concentración final en ppm de los metales pesados en la biomasa de *Azolla caroliniana* después del tiempo de contacto en los diferentes tratamientos. Además para obtener datos representativos se realizó dos lecturas y se obtuvo un dato promedio.

Además, Olguin en 2004 sugirió que la acumulación de fitoquelatinas en *S. minima* es una respuesta directa a la acumulación de plomo y que las fitoquelatinas participan como uno de los mecanismos de tolerancia a la presencia de dicho metal. Por lo anterior, y conociendo que *Salvinia minima y Azolla caroliniana* pertenecen a la familia Salvinaceae, se puede decir que la alta capacidad que presenta *A. caroliniana* para acumular y/o tolerar altas concentraciones de de plomo en sus células, podría estar relacionada a la síntesis de fitoquelatinas.

## 2.4 FACTOR DE BIOCONCENTRACION

**Tabla 16. Factor de bioconcentracion para los diferentes tratamientos**

| Muestra | Metal | Tratamiento | Factor de Bioconcentración |
|---|---|---|---|
| Planta | Cadmio | C | 1,50 |
| | | 1 | 2,00 |
| | | 3 | 2,80 |
| | | 5 | 4,45 |
| | | 7 | 4,12 |
| | | 9 | 2,82 |
| Planta | Plomo | C | 2,15 |
| | | 2 | 2,33 |
| | | 4 | 3,40 |
| | | 6 | 6,50 |
| | | 8 | 5,67 |
| | | 9 | 2,17 |

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

El cuadro muestra el factor de bioconcentración (FBC) en los diferentes tratamientos. Se puede apreciar que el factor más alto se obtuvo en el tratamiento 5 y 6, que se refiere a una concentración inicial de 3 ppm para plomo y 3 ppm para el cadmio.

También, es notorio que la concentración inicial es un factor que influye en la acumulación de estos iones en la biomasa de *Azolla caroliniana*. Los valores máximos observados se encuentran en una concentración inicial de 3 ppm cada uno, luego de esto al probar con una concentración de 4 ppm, el factor de bioconcentración bajó debido posiblemente a que al ser una concentración relativamente alta, durante los primeros días la planta acumuló más plomo y cadmio y posteriormente se saturó y comenzó a desorber parte de los metales a la columna de agua.

Además, en un reciente trabajo (Uysal y Taner, 2009) probaron una concentración inicial de plomo de 1 mgPb/l a una temperatura de 25ºC y se observó que el valor de FBC para *Lemna minor* fue de 1.98, el cual fue menor que el obtenido en este trabajo bajo condiciones similares. Estos datos indican que *Azolla caroliniana* tiene similar y hasta mejor capacidad para remover plomo que *Lemna minor* en condiciones relativamente semejantes de concentración inicial y temperatura.

Por lo anterior, *Azolla caroliniana* demostró ser una importante matriz hiperacumuladora ya que como expresa McGrath y Zhao en 2003, una planta es hiperacumualdora cuando el factor de bioconcentración supera a 1, esto claramente se evidencia en los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.

## 2.5 PORCENTAJE DE REMOCIÓN

**Tabla 17. Porcentaje de remoción para los diferentes tratamientos**

| Muestra | Metal | Tratamiento | Remoción (%) |
|---|---|---|---|
| Agua | Cadmio | C | 60,00 |
| | | 1 | 70,00 |
| | | 3 | 75,00 |
| | | 5 | 81,67 |
| | | 7 | 80,00 |
| | | 9 | 72,50 |
| Agua | Plomo | C | 67,50 |
| | | 2 | 70,00 |
| | | 4 | 75,00 |
| | | 6 | 86,67 |
| | | 8 | 85,00 |
| | | 9 | 70,00 |

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

El cuadro indica el porcentaje de remoción en los diferentes tratamientos. Se puede apreciar que el porcentaje más alto se obtuvo en el tratamiento 5 y 6, que se refiere a una concentración inicial de 3 ppm para el plomo y 3 ppm para el cadmio.

Además, los resultados de este trabajo son similares a los reportados por Khosravi y colaboradores (2005), quienes estudiaron la remoción de plomo por *Azolla filiculoides* en sistemas por lote, utilizando una concentración inicial de 4 mg Pb/l. Después de 15

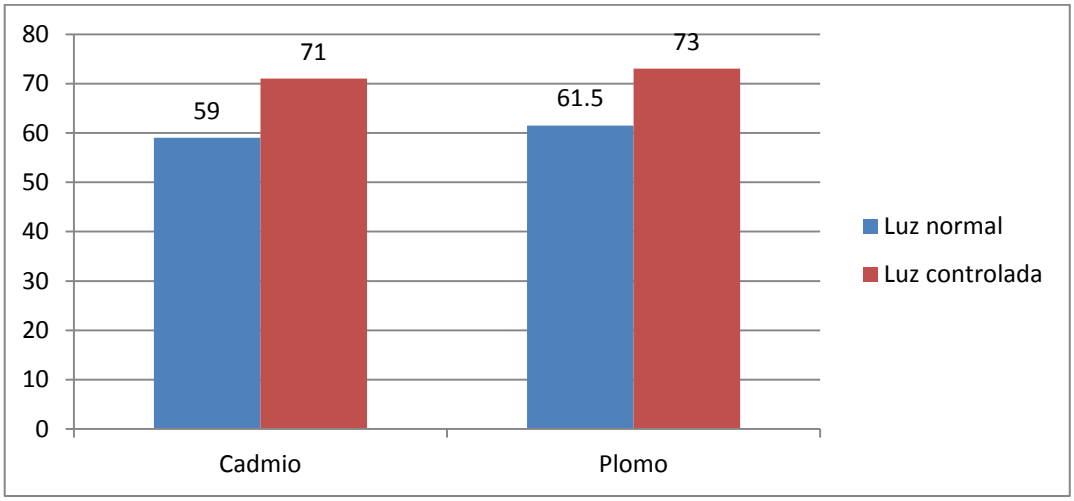
días, se observó una remoción del 61 % del plomo. En este trabajo, *Azolla caroliniana* alcanzó una remoción máxima de aproximadamente un 85 % después de 15 días y en las mismas condiciones iniciales, siendo la concentración de plomo, mucho más alta que la concentración de plomo evaluada por Khosravi y colaboradores en 2005.

# 3. ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO MÁS ADECUADO PARA LA COMPROBACIÓN DE LA FITORREMEDIACIÓN.

## 3.1 INTENSIDAD LUMINOSA

En el gráfico 23 se puede apreciar a los experimentos realizados con concentraciones promedio de 2 ppm, los cuales estuvieron expuestos a dos diferentes intensidades luminosas (12/12 y 18/6), se observa que en los tratamientos con una condición de luz controlada se obtuvo un porcentaje de remoción significativamente mayor ($p<0.05$), alcanzando valores de aproximadamente 72 %, en comparación con los tratamientos con una luz normal, que alcanzaron un porcentaje de remoción de 60% aproximadamente.

**Gráfico 23. Porcentaje de remoción en relación a la intensidad luminosa**



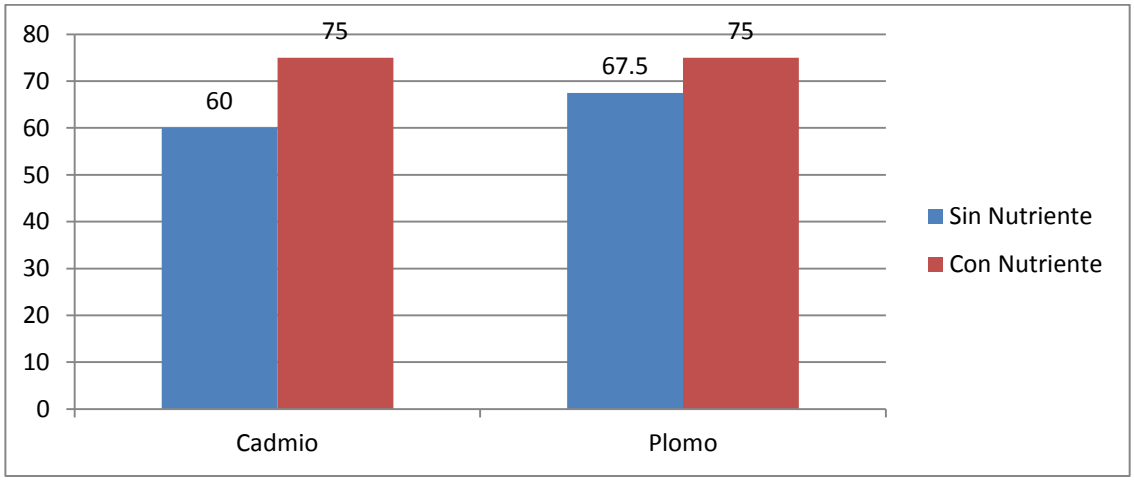

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

Las intensidades lumínicas altas favorecieron, mediante algún mecanismo aun no identificado, un incremento notable en la acumulación de metales en la biomasa de *Azolla caroliniana*.

### 3.2 NUTRIENTE

En el gráfico 24 se puede apreciar a los experimentos realizados con concentraciones de metales pesados promedio de 2 ppm, los cuales estuvieron expuestos a dos diferentes condiciones, la primera fue sin nutriente alguno y la segunda utilizando nutriente "Nutripon", se observa que en los tratamientos con nutriente se obtuvo un porcentaje de remoción significativamente mayor ($p<0.05$), alcanzando valores de aproximadamente 75 %, en comparación con los tratamientos sin nutriente, que alcanzaron un porcentaje de remoción de 63% aproximadamente.

**Gráfico 24. Porcentaje de remoción en relación al nutriente utilizado**




**Fuente:** Ballesteros, 2011.

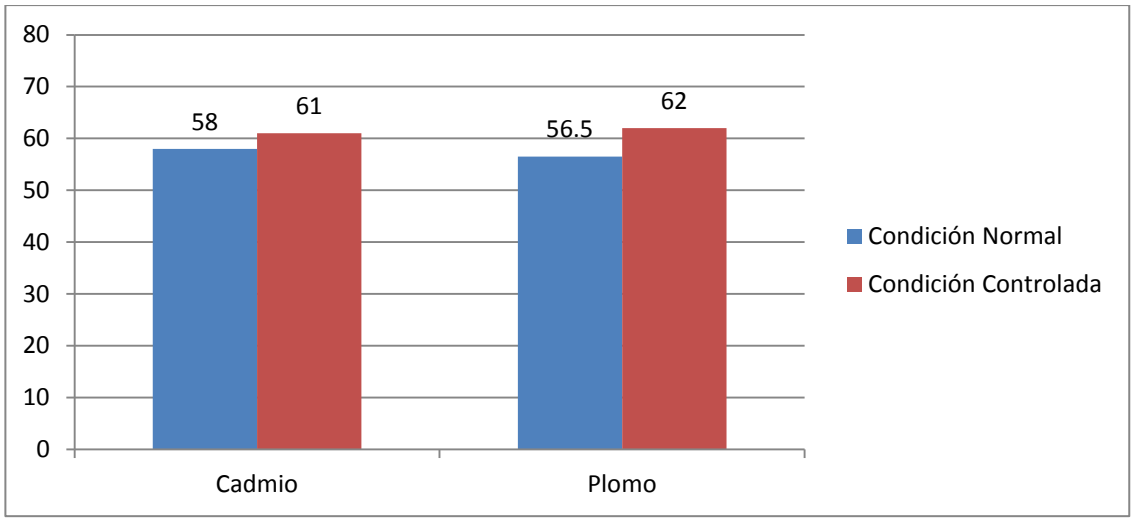
El nutriente cumplió su función esencial de alimentar balanceadamente a la planta para que esta no crezca lenta ni sea sensible a las enfermedades. Si a esto le sumamos el hecho de que no hubo precipitación alguna con las sales metálicas y que la variación del pH tuvo el comportamiento esperado, se puede señalar que *Azolla caroliniana* al estar enriquecida con un nutriente adecuado, facilita la acumulación de metales y por ende aumenta el porcentaje de remoción, ya que el nutriente ayuda a la planta a mantenerse sana durante el proceso de hiperacumulación.

### 3.3 HUMEDAD Y TEMPERATURA

En el gráfico 25 se puede apreciar a los experimentos realizados con concentraciones de metales pesados promedio de 2 ppm, los cuales estuvieron expuestos a dos diferentes condiciones ambientales(humedad y temperatura de la ciudad de Quito y humedad y temperatura controlada, se observa que en los tratamientos con humedad y temperatura

controlada no se obtuvo un porcentaje de remoción significativamente mayor ($p<0.05$), ya que alcanzó valores de aproximadamente 62 %, muy similares a los tratamientos con humedad y temperatura normales, que alcanzaron un porcentaje de remoción de 58% aproximadamente.

**Gráfico 25. Porcentaje de remoción en relación a la humedad y temperatura**




**Fuente:** Ballesteros, 2011.

En un trabajo de Uysal y Taner (2009) se reportó que las altas temperaturas pueden causar un efecto de estrés en las plantas, ya que observaron que hubo un decremento importante en el valor de FBC por *Lemna minor*, cuando estuvo expuesta a diferentes concentraciones de plomo y a la mayor temperatura probada (alrededor de los 30ºC). Bajo este criterio, se puede mencionar que probablemente las condiciones de temperatura y humedad relativa altas causaron en *Azolla caroliniana* un efecto de estrés, por lo que no logró remover tanto metal en su biomasa, obteniéndose resultados muy similares a los obtenidos en condiciones normales.

## 4. ANÁLISIS DE DATOS

**Tabla 18. Test de ANOVA y test de TUKEY para cadmio en agua final**

**One-Way AOV for: Control Tratat1 Tratat3 Tratat5 Tratat7 Tratat9**

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| Between | 5 | 0.54669 | 0.10934 | 18.1 | 0.0000 |
| Within | 12 | 0.07260 | 0.00605 | | |
| Total | 17 | 0.61929 | | | |

Grand Mean 0.5794 CV 13.42

| | Chi-Sq | DF | P |
|---|---|---|---|
| Bartlett's Test of Equal Variances | 24.5 | 5 | 0.0002 |

| | |
|---|---|
| Cochran's Q | 0.6529 |
| Largest Var / Smallest Var | 711.00 |
| Component of variance for between groups | 0.03443 |
| Effective cell size | 3.0 |

| Variable | Mean |
|---|---|
| Control | 0.7967 |
| Tratat1 | 0.3033 |
| Tratat3 | 0.4967 |
| Tratat5 | 0.5300 |
| Tratat7 | 0.8000 |
| Tratat9 | 0.5500 |

| | |
|---|---|
| Observations per Mean | 3 |
| Standard Error of a Mean | 0.0449 |
| Std Error (Diff of 2 Means) | 0.0635 |

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test**

| Variable | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|
| Tratat7 | 0.8000 | A |
| Control | 0.7967 | A |
| Tratat9 | 0.5500 | B |
| Tratat5 | 0.5300 | B |
| Tratat3 | 0.4967 | BC |
| Tratat1 | 0.3033 | C |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Alpha | 0.05 | Standard Error for Comparison | 0.0635 |
| Critical Q Value | 4.751 | Critical Value for Comparison | 0.2133 |

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

**Fuente:** Ballesteros, 2011

No existen diferencias significativas entre los 3 grupos formados, pero a pesar de ello, se puede apreciar que el tratamiento 7 y el tratamiento control difieren del tratamiento 1.

**Tabla 19. Test de ANOVA y test de TUKEY para plomo en agua final**

**One-Way AOV for: Control Tratat2 Tratat4 Tratat6 Tratat8 Tratat9**

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| Between | 5 | 0.27625 | 0.05525 | 4.57 | 0.0145 |
| Within | 12 | 0.14500 | 0.01208 | | |
| Total | 17 | 0.42125 | | | |

Grand Mean 0.5083 CV 21.62

| | Chi-Sq | DF | P |
|---|---|---|---|
| Bartlett's Test of Equal Variances | 0.54 | 5 | 0.9904 |

Cochran's Q 0.3103
Largest Var / Smallest Var 2.2500

Component of variance for between groups 0.01439
Effective cell size 3.0

| Variable | Mean |
|---|---|
| Control | 0.6500 |
| Tratat2 | 0.3000 |
| Tratat4 | 0.5000 |
| Tratat6 | 0.4000 |
| Tratat8 | 0.6000 |
| Tratat9 | 0.6000 |

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 0.0635
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0898

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test**

| Variable | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|
| Control | 0.6500 | A |
| Tratat8 | 0.6000 | AB |
| Tratat9 | 0.6000 | AB |
| Tratat4 | 0.5000 | AB |
| Tratat6 | 0.4000 | AB |
| Tratat2 | 0.3000 | B |

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0898
Critical Q Value 4.751 Critical Value for Comparison 0.3015
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

**Fuente:** Ballesteros, 2011

No existen diferencias significativas entre los 2 grupos formados, pero a pesar de ello, se puede apreciar que el tratamiento control difiere del tratamiento 2.

**Tabla 20. Test de ANOVA y test de TUKEY para cadmio en biomasa**

**One-Way AOV for: Control Tratat1 Tratat3 Tratat5 Tratat7 Tratat9**

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| Between | 5 | 14.0630 | 2.81261 | 82.3 | 0.0000 |
| Within | 12 | 0.4101 | 0.03417 | | |
| Total | 17 | 14.4731 | | | |

Grand Mean 1.7494 CV 10.57

| | Chi-Sq | DF | P |
|---|---|---|---|
| Bartlett's Test of Equal Variances | 14.0 | 5 | 0.0155 |

Cochran's Q 0.5975
Largest Var / Smallest Var 3675.0

Component of variance for between groups 0.92614
Effective cell size 3.0

| Variable | Mean |
|---|---|
| Control | 1.2000 |
| Tratat1 | 0.5967 |
| Tratat3 | 1.4000 |
| Tratat5 | 2.4500 |
| Tratat7 | 3.3000 |
| Tratat9 | 1.5500 |

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 0.1067
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1509

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test**

| Variable | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|
| Tratat7 | 3.3000 | A |
| Tratat5 | 2.4500 | B |
| Tratat9 | 1.5500 | C |
| Tratat3 | 1.4000 | C |
| Control | 1.2000 | C |
| Tratat1 | 0.5967 | D |

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1509
Critical Q Value 4.751 Critical Value for Comparison 0.5070
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

**Fuente:** Ballesteros, 2011

No existen diferencias significativas entre los 4 grupos formados, pero a pesar de ello, se puede apreciar que el tratamiento 7 difiere del tratamiento 1

**Tabla 21. Test de ANOVA y test de TUKEY para plomo en biomasa**

**One-Way AOV for: Control Tratat2 Tratat4 Tratat6 Tratat8 Tratat9**

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| Between | 5 | 14.4450 | 2.88900 | 193 | 0.0000 |
| Within | 12 | 0.1800 | 0.01500 | | |
| Total | 17 | 14.6250 | | | |

Grand Mean 1.8500 CV 6.62

| | Chi-Sq | DF | P |
|---|---|---|---|
| Bartlett's Test of Equal Variances | 1.75 | 5 | 0.8822 |

Cochran's Q 0.4444
Largest Var / Smallest Var 4.0000

Component of variance for between groups 0.95800
Effective cell size 3.0

| Variable | Mean |
|---|---|
| Control | 1.4000 |
| Tratat2 | 0.7000 |
| Tratat4 | 1.7000 |
| Tratat6 | 2.6000 |
| Tratat8 | 3.4000 |
| Tratat9 | 1.3000 |

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 0.0707
Std Error (Diff of 2 Means) 0.1000

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test**

| Variable | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|
| Tratat8 | 3.4000 | A |
| Tratat6 | 2.6000 | B |
| Tratat4 | 1.7000 | C |
| Control | 1.4000 | CD |
| Tratat9 | 1.3000 | D |
| Tratat2 | 0.7000 | E |

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1000
Critical Q Value 4.751 Critical Value for Comparison 0.3359
There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

No existen diferencias significativas entre los 5 grupos formados, pero a pesar de ello, se puede apreciar que el tratamiento 8 difiere del tratamiento 2

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El máximo valor del porcentaje de remoción se observó en el tratamiento 5 y 6, que tenían una concentración inicial de 3 ppm de cadmio y 3 ppm de plomo, alcanzando un punto máximo de remoción de 81,67 y 86,67 % respectivamente.

- La disminución del contenido de metales en el medio y la presencia de metales en el tejido vegetal demostró que *A. caroliniana* absorbe plomo más eficazmente que el cadmio.

- *Azolla caroliniana* mostró mayor capacidad de bioconcentración de plomo y cadmio en comparación a otras macrófitas acuáticas en sistemas de fitorremediación.

- En el experimento, *Azolla caroliniana* mostró poder sobrevivir a la contaminación por plomo, no así al cadmio, demostrando que este helecho posee mecanismos adecuados para la tolerancia de ciertos metales pesados, en este caso al plomo.

- La intensidad luminosa y el nutriente utilizado influyeron de manera directa en la acumulación de metales pesados, no así la humedad y temperatura, que no demostraron ser un factor que influya en la fitorremediación.

- Por lo anterior, se recomienda realizar más estudios sobre la influencia de la intensidad lumínica en los procesos de acumulación de metales por partes de plantas acuáticas.

- Ya que la temperatura y humedad no fueron factores determinantes en el proceso de hiperacumulación, se podría decir, que se puede realizar una fitorremediación con este helecho ya sea en climas cálidos como en templados.

- Observando los valores del factor de bioconcentración tanto para el plomo como para el cadmio, se pudo confirmar que el mecanismo predominante de *Azolla caroliniana* fue la acumulación intracelular, debido posiblemente a tener mucha superficie disponible para la acumulación así como para la adsorción del metal. Se sabe además, que los iones metálicos son adsorbidos a la superficie de las células por las interacciones entre los iones metálicos y algunos grupos funcionales metálicos tales como carboxilos, fosfatos, hidroxilos, amino, tioles, etc., los cuales se encuentran presentes en las paredes celulares (Fermolinas, 2006).

- En todos los tratamientos de hiperacumulación se ha observado una cinética de acumulación gradual, caracterizada por presentar un periodo inicial con elevadas tasas de bioconcentración seguido por un periodo con bajas tasas de bioconcentración como los presentados con concentraciones iniciales de 4 ppm para plomo y cadmio.

- *Azolla caroliniana* contrario con lo que sucedió con el plomo, no presentó mecanismos adecuados de tolerancia al cadmio, por lo cual, no hiperacumuló suficiente metal como para dejar el agua resultante con un promedio de 0,2 ppm que es lo que indica le legislación vigente para descargas de agua al sistema de alcantarillado público.

- Por lo anterior, queda demostrado que *Azolla caroliniana* resulta ser un helecho eficaz para la remoción de plomo en agua contaminadas, por lo que se podría implementar con dicho helecho, un sistema de fitorremediación en escalas mayores.

- *Azolla caroliniana* resultó ser una gran especie hiperacumuladora, por lo que es apta para ser llevada a un sistema de recuperación de metales y mantener así el equilibrio en el ecosistema.

- La posibilidad de que *Azolla caroliniana* pueda presentar un alto contenido de fitoquelatinas que expliquen su alta capacidad para acumular plomo y cadmio, resulta muy interesante y se recomienda que se investigue este factor en futuros trabajos.

- En condiciones naturales, cuando se presenta la contaminación por plomo o cadmio, es la planta entera la que sufre la agresión, por lo que se hace necesario impulsar más estudios y modelos de experimentación para descubrir los mecanismos fisiológicos de esta planta (recepción del impacto, alteraciones funcionales, metabólicas, hormonales y citogenéticas) que puedan ayudar a una mejor comprensión del desarrollo de resistencia y las posibles respuestas de este organismo.

- Con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se comprobó la hipótesis alternativa planteada en el mismo, confirmando que *Azolla caroliniana* captura por hiperacumulación metales pesados (plomo y cadmio) en el medio.

# BIBLIOGRAFÍA


- Aguilar V. 2003. **Niveles de Plomo en sangre y factores asociados, en niños del Municipio de Centro Habana**. Revista Cubana Hig Epidemiol; 41(2). Disponible en línea: http://www.estrucplan.com.ar/articulos/verarticulo.asp?idarticulo=1149. Consulta. Septiembre 2011.
- Ansola G. 2003. **Utilización de humedales artificiales en la depuración de aguas residuales**. En: El agua, un bien para todos. Conservación, recuperación y usos. Editorial Ramos. Salamanca – España. Pp 145-170.
- Argibay P y Cassano P. 2010. **Depresión Y Neuroplasticidad. Interacción De Los Sistemas Nervioso, Endocrino E Inmune.** Disponible en línea: http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v70n2/v70n2a15.pdf. Consulta: Febrero 2011.
- Alzogaray R. 2009. **Un veneno llamado cadmio**. Disponible en línea: http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=News&file=article&sid=2042. Consulta: Junio 2011.
- Black J. 1995. **Posibilidades de Absorción: Fitorremediación**. Revista Environ Health Perspectives. Pp 106-108.
- Boyd C. 1990. **Plantas vasculares acuáticas para la remoción de nutrientes de aguas contaminadas**. Revista Econ Bot. Pp 95-103.
- Cabaleiro T y Lafuente A. 2008. **Posible papel protector de la melatonina frente a la toxicidad neuroendocrina inducida por cadmio**. Disponible en línea: http://www.uv.es/aetoxweb/revista/revtox.25.1.3/revtox.25.1.3.pdf. Consulta: Septiembre 2011.
- Castillo F. 2005**. Biotecnología Ambiental**. Editorial Tebar. Madrid – España. Pp 100-130

- Cavallaro S. 2003. **Cadmio, un tóxico encubierto**. Disponible en línea: http://www.monografias.com/trabajos28/cadmio-toxico-encubierto/cadmio-toxico-encubierto.shtml. Consulta: Marzo 2011.
- Cunningham A y Berti W. 1993. **Remediación de suelos contaminados con las plantas verdes.** Disponible en línea: http://www.springerlink.com/content/k101764357m568ug. Consulta: Abril 2011.
- Delgadillo A y González C. 2011. **Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación**. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo-México. Disponible en línea: http://www.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/viewFile/814/565. Consulta: Agosto 2011.
- Denny H. 1987. **Tolerancia al Zinc en *Betulla spp*.** Revista New Phytol. Pp 525-534.
- Dietz F. 1972. **Enrichment of heavy metals in submerged plants**. Adv Water Pollut Res Proc Int Cont. Pp 53-72.
- Escobar J. 2002. **La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar**. ONU- División de Recursos Naturales e Infraestructura. Disponible en línea: http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/aidis-ar/lcl1799e.pdf. Consulta: Octubre 2011.
- Fermolinas P. 2006. **Microbiología y parasitología**. Disponible en línea: http://www.monografias.com/trabajos21/microbiologia-parasitologia/microbiologia-parasitologia.shtml. Consulta: Octubre 2011.
- Flathman P. 1998. **Fitorremediación: puntos de vista de una tecnología verde emergente**. Revista: Soil Contamination. Pp 415-432.
- Frenk J. 1993. **La salud de la Población. Hacia una nueva salud pública**. Conacyt. Pp 164.
- Gagneten A. 2008. **Respuestas del zooplancton a la contaminación por cromo en la cuenca del río Salado inferior (Santa Fe, Argentina)**. Instituto Nacional de Limnología (CONICET- UNL). Santa Fe. Disponible en línea: http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/tesis/bitstream/1/87/1/tesis.pdf. Consulta: Agosto 2011.

- Gardner B. 2009. **Reacciones de precipitación.** Revista virtual "Tp-Laboratorio Químico". Disponible en línea: http://tplaboratorioquimico.blogspot.com/2009/01/reacciones-de-precipitacin.html. Consulta: Noviembre 2011.
- Garzón A. 2006. **Información Plomo y Cadmio en Ecuador**. Ministerio del Ambiente – Republica del Ecuador. Disponible en línea: http://www.unep.org/hazardoussubstances/Portals/9/Lead_Cadmium/docs/submissions/Submis_GOV_ECUADOR.pdf. Consulta: Octubre 2011.
- Gieco L y Mata C. 2009. **Cadmio en Gestión Ambiental**. Disponible en línea: http://www.ecogenesis.com.ar/index.php?sec=articulo.php&Codigo=30. Consulta: Enero 2011.
- Gil M y Torres A. 2006. **Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia Argentina continental**. Revista de Biología Marina y Oceanografía 41(2): 167-176. Disponible en línea: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-19572006000200004&script=sci_arttext. Consulta: Septiembre 2011.
- Godt J, Scheidig F, Grosse C, Esche V, Brandenburg P y Reich A. 2006. **La toxicidad del cadmio y los riesgos resultantes para la salud humana**. Disponible en línea: http://viaclinica.com/article.php?pmc_id=1578573. Consulta: Diciembre 2010.
- Gutiérrez J y Izquierdo R. 2004. **El plomo como contaminante alimentario**. Disponible en línea: http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=91921303. Consulta: Enero 2011.
- Herrera L. 2003. **"Mercurio y Plomo contaminan el lago Yahuarcocha".** Tomado de Diario El Comercio. Disponible en línea: http://www.bnamericas.com/news/aguasyresiduos/Mercurio_y_plomo_contaminan_lago_Yahuarcocha. Consulta: Octubre 2011.
- Hölcke O. 2009. **Ecuador Una Lucha Sutil**. Pp. 1-2. Disponible en línea: http://www.biodiversity-day.info/uploads/media/Una_lucha_sutil.pdf. Fecha de Consulta: Junio 2011

- Howard T. 2000. **Heavy Metals in the Environment. Using wetlands for their removal**. Lewis Publishers. Pp. 31-48
- Hutchinson E. 2011. **Expresión del factor HIF-1α y su relación con la respuesta a la radioterapia**. Disponible en línea: http://www.biocancer.com/journal/1395/22-marcadores-de-hipoxia. Consulta: Marzo 2011.
- Jacobs D. 1996. **Los efectos del plomo en el cuerpo humano**. Revista *Lead Perspectives*. Pp 2-32
- Jorgensen y Leon-Yanez. 1999. **Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador**. Editorial Missouri Botanical Garden Press. Pp 174-177.
- Khosravi M, Taghi M y Rakhshaee R. 2005. Toxic effect of Pb, Cd, Ni and Zn on *Azolla filiculoides* in the International Anzali Wetland. Disponible en línea: http://www.sid.ir/en/VEWSSID/J_pdf/92220050105.pdf. Consulta: Noviembre 2011.
- Laubstein U, 2010. **La intoxicación por metales**. Disponible en línea: http: www.absolum.org. Consulta: Septiembre 2011.
- Lenntech B, 2009. **Agua residual & purificación del aire**. Disponible en línea: http://www.lenntech.es/plomo-y-agua.htm. Consulta: Enero 2011.
- Mac G. 2002. **Toxicidad, crecimiento y acumulación de cobre, plomo y zinc en manglar *Avicena marina***. Revista contaminación marina. Pp 5-84.
- Marcovecchio J y Moreno V. 1991. **Metal accumulation in tissues of sharks from the Bahía Blanca Estuary, Argentina**. Marine Environmental Research vol. 31: 263-274. Disponible en línea: http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Bioac.htm, Fecha de consulta: Octubre 2011.
- McGrath S y Zhao F. 2003. **Fitorremediación de metales, metaloides y radionucleidos.** Revista virtual "Agronon". Disponible en línea: http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/7666/1/ECO_16%282%29_04.pdf. Consulta: Noviembre 2011.
- Monserrat A y Celsi C. 2005. **Guía Para El Reconocimiento De Algunas Plantas Vasculares De Las Dunas Y Marismas De La Costa Atlántica**

**Bonaerense**. Disponible en línea: http://www.procostas.org/cms/docs/Plantas_vasculares%20costeras.pdf. Consulta: Marzo 2011.

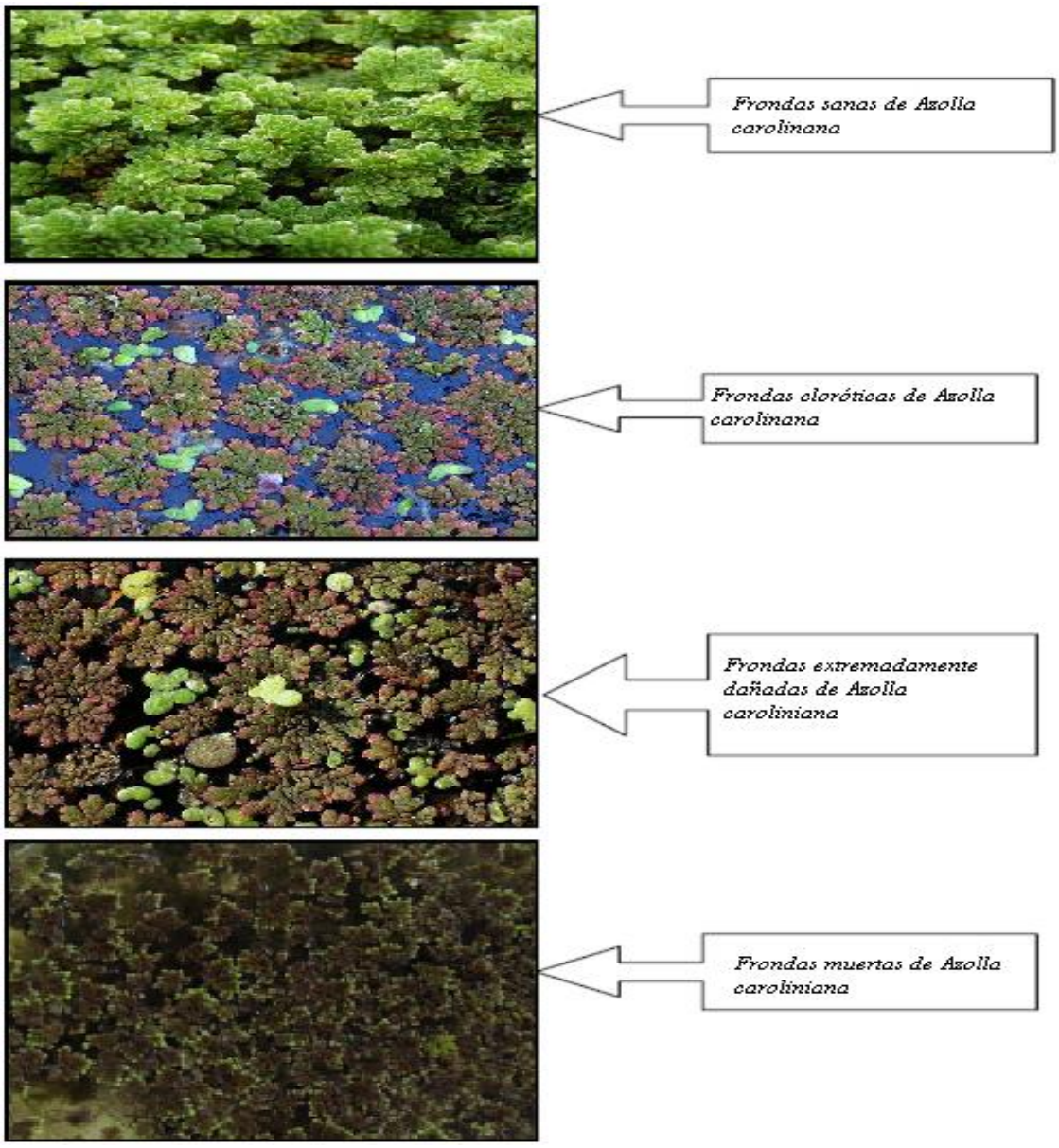
- Moreno R. 1999. **Abundancia de los metales pesados en la biósfera**. En: Contaminación ambiental por metales pesados: Impacto en los seres vivos. AGT Editor SA.
- Navarro J, Aguilar A y Lopez J. 2007. **Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas**. Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente. Pp 10-25. Disponible en línea: http://www.revistaecosistemas.net/pdfs/488.pdf. Consulta: Julio 2011.
- Newtenberg A, 2010. **¿Cuál es el efecto del Plomo en la salud humana?** Disponible en línea: http://www.sinia.cl/1292/fo-article-34246.pdf. Consulta: Diciembre 2010.
- Nishikawa K. 2001. **Isolation, growth, ultrastructure, and metal tolerance of the green alga, *Chlamydomonas acidophila***. Revista Biosci Biotechnol Biochem. Pp 50-56.
- Novotny V. 1996. **Diffuse Sources of Pollution by Toxic Metals and Impact on Receiving Waters**. En: *Heavy Metals; Problems and Solutions*. Salomons W. Förstner U. Mader P. Enviromental Science Springer-Verlag Berlin, Germany. Pp 33-52
- Nuñez R y Vong Y. 2004. **Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones**. Disponible en línea: http://suel.wikispaces.com/file/view/Fitorremediacion_Fundam_Aplic.pdf. Consulta: Julio 2011.
- Olguin E. 1994. **Aprovechamiento de plantas acuáticas para el tratamiento de aguas residuales**. Revista "Tecnologías Ambientales". México. Pp 11-20.
- Padilla A. 2006. **Examen del plomo y cadmio en Honduras**. Disponible en línea: http: //www.unep.org/hazardoussubstances/Portals/9/Lead_Cadmium/docs/submissions/Submis_GOV_HND.pdf. Consulta: Septiembre 2011.

- Payne R. 2000. ***Spirulina*** **como agente de biorremediación: Interacción con metales e interacción con anhidro carbónico**. Rhodes University magazine, United States. Pp: 50-56.
- Porta A y Caffini N. 1998. **Fitoquelatinas: Estructura, Rol Metabólico y Aplicaciones Ambientales.** LIPROVE, Facultad de Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Disponible en línea: http://www.latamjpharm.org/trabajos/18/1/LAJOP_18_1_2_1_WYV34TRYG2.pdf. Consulta: Julio 2011.
- Ramírez S. 1998. **Fitoquelatinas y Péptidos Relacionados**. Laboratorio de Ecotoxicología y Química Ambiental, Depto. de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina. Disponible en línea: http://www.latamjpharm.org/trabajos/18/1/LAJOP_18_1_2_1_WYV34TRYG2.pdf. Consulta: Julio 2011.
- Rauser W. 1999. **Estructura y función de quelantes metálicos producidos por plantas**. Revista Cell Biochem Biophys. Pp 1-29.
- Reed R. 1990. **Tolerancia a los metales en algas eucarióticas y procarióticas**. Revista CRC Press. Pp 105-118.
- Rehaman A. 2003. **Isolation, growth, metal tolerance and metal uptake of the green alga, *Chlamydomonas***. Revista Pak J Zool. Pp 37-41.
- Rodriguez M y Sandalio L. 2008. **Toxicidad del Cadmio en Plantas. Asociación Española de Ecología Terrestre**. Disponible en línea: http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8734/1/ECO_17%283%29_14.pdf. Consulta: Septiembre 2011.
- Romero M. 2008. **Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants**. Revista virtual "Plant cell and environment". Disponible en línea: http://www.slideshare.net/l1u2i3u4s5/revista-environment. Consulta: Septiembre 2011.
- Salager J. 1998. **Adsorción y Mojabilidad**. Universidad de los Andes. Mérida – Venezuela. Versión #2. Disponible en línea: http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S160A_AdsorcionMojabilidad.pdf

- Salomons W. 1995. **Metales Pesados. Problemas y Soluciones**. Berlín: Springer. 412p
- Sánchez R, 1999, **Abundancia de los metales pesados en la biósfera**. En: Contaminación ambiental, por metales pesados: Impacto en los seres vivos. Editorial A. G. T. S. A. México. Pp 15-21
- Tomotada K. 2001. **Práctica y perspectiva actuales de la biorremediación**. Disponible en línea: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VSD-4471V7W. Consulta: Diciembre 2010.
- Uysal Y y Taner F. 2009. **Effect of pH, temperature and lead concentration on the bioremoval of lead from water using *Lemna minor*.** Inter Jour Phytorrem. Disponible en línea: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19810357. Consulta: Noviembre 2011.
- Valls M. 1999. **Análisis funcional y aplicaciones biotecnológicas de las metalotioneínas**. Universidad de Barcelona-España. Disponible en línea: http://tesis.com.es/documentos/analisis-funcional-aplicaciones-biotecnologicas-metalotioneinas/. Consulta: Agosto 2011.
- Welsh R. 1991. **Remoción de plomo y cobre por macrófitas acuáticas en dos lagos ingleses**. Disponible en línea: http://edafologia.ugr.es/conta/tema15/introd.htm. Consulta: Febrero 2011.
- Yánez P. 2007. **Biometría y Bioestadística fundamentales.** Quito-Ecuador. Pp 108

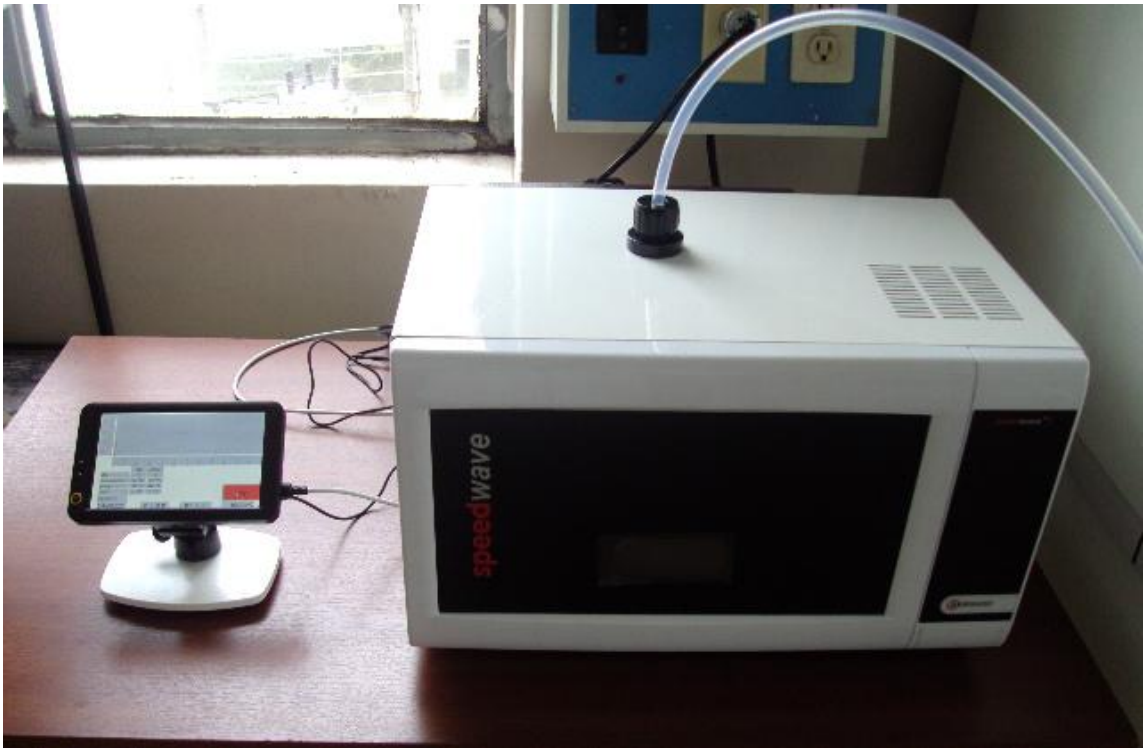
# ANEXOS

## ANEXO 1. GUÍA PARA DIFERENCIAR DAÑOS EN LAS FRONDAS DE *Azolla caroliniana* EXPUESTA A METALES PESADOS.




**Fuente:** Ballesteros, 2011.

## ANEXO 2. DIGESTOR MICROONDAS MARCA BERGHOF MODELO MWS-2




**Fuente:** Ballesteros, 2011

## ANEXO 3. MÉTODO DE BERGHOF PARA DIGESTIÓN DE PLANTAS SECAS

# MICROWAVE DIGESTION OF DRIED PLANTS

**Summary**

Dried plants are digested in a acid solution using a Berghof microwave digestion system

**Equipment**

| Type | Manufacturer |
|---|---|
| MWS-2 | Berghof Products + Instruments, Germany |
| DAP-60K | Berghof Products + Instruments, Germany |

**Reagents**

$HNO_3$ 65%

**Procedure**

Weigh 300 mg of the sample into the digestion vessel and add 5 ml of nitric acid. Shake the mixture carefully or stirr with a clean teflon or glass bar. Wait at least 20 min. before the vessel is closed. Heat in the microwave oven with the following program.

**Temperature Program**

| Step | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|
| T [°C] | 145 | 190 | 100 | |
| Power* [%] | 75 | 90 | 40 | |
| Time [min] | 5 | 10 | 10 | |

To avoid foaming and splashing wait until the vessels have cooled to room temperature (about 20 min). Carefully open the digestion vessel in a fume hood wearing hand, eye and body protection since a large amount of gas will be produced during the digestion process.

**Results**

Clear solution

Notes: This application serves only as a guide line and may need to be optimised for your sample.
*This application is outlined for 10 samples. Increase or decrease the power by 10% per sample, when using more or less samples. Minimum power is 40% indepentant of the sample number.

**Berghof Products + Instruments GmbH**
Laboratory Technology

Harretstr. 1 • 72800 Eningen • Germany
Tel.: +49 7121 894-0 • Fax: +49 7121 894-300
http://www.berghof-instruments.de

Contact:
E-Mail: info@berghof-instruments.de

BERGHOF
PRODUCTS + INSTRUMENTS
ZUNDEL Holding Enterprise

**ANEXO 4. MÉTODO DE BERGHOF PARA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS EN EFLUENTES**

# DETERMINATION OF HEAVY METALS IN EFFLUENTS

**Summary**

Effluents (COD <7 g/l) are digested in an acid solution using a Berghof microwave digestion system. The solution is used for the determination of heavy metals by ICP-AES, GF-AAS and hydride-AAS. The applicability given for Ag, Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mo, Mn, Ni, Pb, Sb and Zn.

**Equipment**

| Type | Manufacturer |
|---|---|
| MWS-2 | Berghof Products + Instruments, Germany |
| DAP-60K | Berghof Products + Instruments, Germany |

**Reagents**

$HNO_3$ 65%  $H_2O_2$ 30%

**Procedure**

Before heated in the microwave oven 30ml of the sample are mixed carefully with 5 ml nitric acid and 2 ml hydrogenperooxide. Allow the mixture to react for a period of at least 20 minutes. Close the vessel and heat in the microwave oven with the following program.

**Temperature Program**

| Step | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|
| T [°C] | 160 | 200 | 100 | |
| Power* [%] | 80 | 80 | 80 | |
| Time [min] | 5 | 5 | 10 | |

Wait until the vessels have cooled to room temperature. Carefully open the digestion vessel in a fume hood wearing hand, eye and body protection.

If the samples are not digested completely, add some more ml of peroxide and heat again. The solution is transfered to volumetric flask and filled to 50 ml with water.

**Results**

Usually clear, colourless solutions are obtained which can be analysed for Ag, Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Ni, Pb, Sb and Zn by ICP-AES, GF-AAS or hydride-AAS

Notes: This application serves only as a guide line and may need to be optimised for your sample.
*This application is outlined for 10 samples. Increase or decrease the power by 10% per sample, when using more or less samples. Minimum power is 40% indepentant of the sample number.

**Berghof Products + Instruments GmbH**
Laboratory Technology

Harretstr. 1 • 72800 Eningen • Germany
Tel.: +49 7121 894-0 • Fax: +49 7121 894-300
http://www.berghof-instruments.de

**Contact:**
E-Mail: info@berghof-instruments.de

BERGHOF
PRODUCTS + INSTRUMENTS
ZUNDEL Holding Enterprise

## ANEXO 5. ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA MARCA VARIAN

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

## ANEXO 6. VALORES DE F

| g. L del denominador | Nivel de significancia | g.l. del numerador | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 9 | . 100 | 3.36 | 3.01 | 2.81 | 2.69 | 2.61 | 2.55 | 2.51 | 2.47 | 2.44 |
| | . 050 | 5.12 | 4.12 | 3.86 | 3.63 | 3.48 | 3.37 | 3.29 | 3.23 | 3.18 |
| | . 025 | 7.21 | 5.71 | 5.08 | 4.72 | 4.48 | 4.32 | 4.20 | 4.10 | 4.03 |
| | . 010 | 10.56 | 8.02 | 6.99 | 6.42 | 6.06 | 5.80 | 5.61 | 5.47 | 5.35 |
| 10 | . 100 | 3.29 | 2.92 | 2.73 | 2.61 | 2.52 | 2.46 | 2.41 | 2.38 | 2.35 |
| | . 050 | 4.46 | 4.10 | 3.71 | 3.48 | 3.33 | 3.22 | 3.14 | 3.07 | 3.02 |
| | . 025 | 6.94 | 5.46 | 4.83 | 4.47 | 4.24 | 4.07 | 3.95 | 3.85 | 3.78 |
| | . 010 | 10.04 | 7.56 | 6.55 | 5.99 | 5.64 | 5.20 | 5.20 | 5.06 | 4.94 |
| 11 | . 100 | 3.23 | 2.86 | 2.66 | 2.54 | 2.45 | 2.39 | 2.34 | 2.30 | 2.27 |
| | . 050 | 4.84 | 3.98 | 3.59 | 3.36 | 3.20 | 3.09 | 3.01 | 2.95 | 2.90 |
| | . 025 | 6.72 | 5.26 | 4.63 | 4.28 | 4.04 | 3.88 | 3.76 | 6.66 | 3.59 |
| | . 010 | 9.65 | 7.21 | 6.22 | 5.67 | 5.32 | 5.07 | 4.89 | 4.74 | 4.63 |
| 12 | . 100 | 3.18 | 2.81 | 2.61 | 2.48 | 2.39 | 2.33 | 2.28 | 2.24 | 2.21 |
| | . 050 | 4.75 | 3.89 | 3.49 | 3.26 | 3.11 | 3.00 | 2.91 | 2.85 | 2.80 |
| | . 025 | 6.55 | 5.10 | 4.47 | 4.12 | 3.89 | 3.73 | 3.61 | 3.51 | 3.44 |
| | . 010 | 9.33 | 6.93 | 5.95 | 5.41 | 5.06 | 4.82 | 4.64 | 4.50 | 4.39 |
| 13 | . 100 | 3.14 | 2.76 | 2.56 | 2.43 | 2.35 | 2.28 | 2.23 | 2.20 | 2.16 |
| | . 050 | 4.67 | 3.81 | 3.41 | 3.18 | 3.03 | 2.92 | 2.83 | 2.77 | 2.71 |
| | . 025 | 6.41 | 4.47 | 4.35 | 4.00 | 3.77 | 3.60 | 3.48 | 3.39 | 3.31 |
| | . 010 | 9.07 | 6.70 | 5.74 | 5.21 | 4.86 | 4.62 | 4.44 | 4.30 | 4.19 |
| 14 | . 100 | 3.10 | 2.73 | 2.52 | 2.39 | 2.31 | 2.24 | 2.19 | 2.15 | 2.12 |
| | . 050 | 4.60 | 3.74 | 3.34 | 3.11 | 2.96 | 2.85 | 2.76 | 2.70 | 2.65 |
| | . 025 | 6.30 | 4.86 | 4.24 | 3.89 | 3.66 | 3.50 | 3.38 | 3.29 | 3.21 |
| | . 010 | 8.86 | 6.51 | 5.56 | 5.04 | 4.69 | 4.46 | 4.28 | 4.14 | 4.03 |
| 15 | . 100 | 3.07 | 2.70 | 2.49 | 2.36 | 2.27 | 2.21 | 2.16 | 2.12 | 2.09 |
| | . 050 | 4.54 | 3.68 | 3.29 | 3.06 | 2.90 | 2.79 | 2.71 | 2.64 | 2.59 |
| | . 025 | 6.20 | 4.77 | 4.15 | 3.80 | 3.58 | 3.41 | 3.29 | 3.20 | 3.12 |
| | . 010 | 8.68 | 6.36 | 5.42 | 4.89 | 4.56 | 4.32 | 4.14 | 4.00 | 3.89 |
| 16 | . 100 | 3.05 | 2.67 | 2.46 | 2.33 | 2.24 | 2.18 | 2.13 | 2.09 | 2.06 |
| | . 050 | 4.49 | 3.63 | 3.24 | 3.01 | 2.85 | 2.74 | 2.66 | 2.59 | 2.54 |
| | . 025 | 6.12 | 4.69 | 4.08 | 3.73 | 3.50 | 3.34 | 3.22 | 3.12 | 3.05 |
| | . 010 | 8.53 | 6.23 | 5.29 | 4.77 | 4.44 | 4.20 | 4.03 | 3.89 | 3.78 |
| 17 | . 100 | 3.03 | 2.64 | 2.44 | 2.31 | 2.22 | 2.15 | 2.10 | 2.06 | 2.03 |
| | . 050 | 4.45 | 3.59 | 3.20 | 2.96 | 2.81 | 2.70 | 2.61 | 2.55 | 2.49 |
| | . 025 | 6.04 | 4.62 | 4.01 | 3.66 | 3.44 | 3.28 | 3.16 | 3.06 | 2.98 |
| | . 010 | 8.40 | 6.11 | 5.18 | 4.67 | 4.34 | 4.10 | 3.93 | 3.79 | 3.68 |

**Fuente:** Yánez, 2007

**ANEXO 7. UNIDADES EXPERIMENTALES DENTRO DEL MICROCLIMA CREADO**

**Fuente:** Ballesteros, 2011

**Fuente:** Ballesteros, 2011.

**ANEXO 8. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *Azolla caroliniana* EN HERBARIO NACIONAL**

# Sección Botánica
# Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales

"Herbario Nacional"
Avenida Río Coca, Casilla Postal 07-07-8976
Tel/Fax (593-2) 2441-592, 2449 824
Quito, Ecuador

NOMBRE: José Ballesteros
FECHA: 07 Abril 2011

| Nº | FAMILIA | ESPECIE |
|---|---|---|
| 1 | SALVINIACEAE | *Azolla* cf. *caroliniana* Willd. |

TOTAL DE ESPECIES: 1