

# Uso de la *Lemna minor* L para la fitoextracción de cobre disuelto en una presa mexicana

Icela Barceló-Quintal<sup>\*1</sup>, Carlos Vázquez-Zago<sup>1</sup>, Julisa García-Albortante<sup>1</sup>, Mónica Salazar-Peláez<sup>1</sup>,

Ulrico López-Chuken<sup>2</sup>, Carlos Zetina-Moguel<sup>3</sup>

División de Ciencias Básicas e Ingeniería<sup>1</sup>, Facultad de Ciencias Químicas<sup>2</sup>, Facultad de Ingeniería<sup>3</sup>

Universidad Autónoma de Nuevo León<sup>2</sup>, Universidad Autónoma de Yucatán<sup>3</sup>

México, D.F.<sup>1</sup>; Monterrey, N.L.<sup>2</sup>; Mérida, Yuc.<sup>3</sup>; México

ibarceloq@gmail.com, ulrico\_chuken@hotmail.com, c.zetina.moguel@gmail.com

**Abstract**— Extraction of copper by *Lemna minor* L. in water from the dam José Antonio Alzate of the Lerma River Basin, State of Mexico, was effected. Cu was tested as  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  and Cu-EDTA. The development of the plant and monitoring its ability as extractor was conducted in pilot reactors with water from this dam without Cu and the two aforementioned species. The selectivity of the plant in  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  and Cu-EDTA was carried out by the chemical speciation. The plant assimilated the two forms but better the ionic form. A marked decrease in copper was noted at 50 days. There was an order of bioaccumulation:  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} > \text{Cu-EDTA}$ , the plant proved a good hyperaccumulator.

**Keyword**— Phytoextraction, *Lemna minor* L., copper, bioaccumulation, chemical speciation, Alzate dam.

**Resumen**— La extracción de cobre por *Lemna minor* L. en agua de la presa José Antonio Alzate de la Cuenca del Río Lerma en el Estado de México, se ensayó como  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  y Cu-EDTA. El desarrollo de la planta y el monitoreo de su capacidad fitoextractora se condujo en reactores piloto con agua de esta presa sin Cu y con las dos especies citadas. La selectividad de la planta en las formas  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  y Cu-EDTA se llevó a cabo mediante especiación química. La planta asimiló las dos formas, sin embargo, fue mejor la forma iónica. Se observó una marcada disminución de cobre a los 50 días y un orden de bioacumulación  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} > \text{Cu-EDTA}$ , la planta resultó ser una buena hiperacumuladora

**Palabras clave**— Fitoextracción, *Lemna minor* L., cobre, bioacumulación, especiación química, presa Alzate.

## I. INTRODUCCIÓN

La depredación de los recursos naturales de las cuencas hídricas en México está limitando la disponibilidad y calidad del agua, lo cual está estrechamente vinculado con la falta de acciones eficaces y eficientes en saneamiento, por lo que urgen innovaciones tecnológicas orientadas a generar estrategias que permitan el rescate de las cuencas y un futuro desarrollo sustentable estableciendo redes de colaboración pertinentes para atender integralmente los problemas compartidos, bajo esquemas de colaboración regional e interinstitucional. En la Cuenca Alta del río Lerma en el Estado de México, el problema de la contaminación del agua es una situación grave de salud para las poblaciones ribereñas, así como para la poca biota existente y es urgente su resolución, su control o su atenuación (Barceló *et al*, 2013; Barceló *et al*, 2012; Atlas, 2010; Barceló *et al*, 2008; Barceló *et al*, 2005; Barceló, 2000). Clasificada por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) como Cuenca 1 del Estado de México, (CNA, 1993), situada en el sur del valle de Toluca, comprende desde el origen del río Lerma hasta donde se localiza la presa José Antonio Alzate (Atlas, 2010). Una actividad económica relevante en la década de los ochenta en la presa, era la pesca de especies tales como la *Cambarellus montezumae*, *Algansea spp.* y del microcrustáceo *Daphnia pulex*, esta última es una fuente importante de proteína y su uso principal es para alimento de la trucha, peces de ornato y aves de corral. Especialmente la explotación de este microcrustáceo en un tiempo fue parte importante de la economía de la población aledaña a la presa, y debido a la situación ambiental por un lado ha escaseado, y por otro al ser bioacumulante presenta contaminación por metales como el cobre y no se puede en la actualidad ser utilizado para el comercio (Zarazúa, 2000). Existe una sección de la presa con agua de mejor calidad comparada con el resto de la misma; (Ávila, 2001; Barceló, 2000; Barceló *et al*, 1999), y que de ser

tratada y descontaminada, tendría condiciones para la cría de la *Daphnia pulex* (Zarazúa, 2000; Ávila, 2001; Márquez, 2008), a esta sección, se le ha denominado zona E, figura 1 (Márquez, 2008).

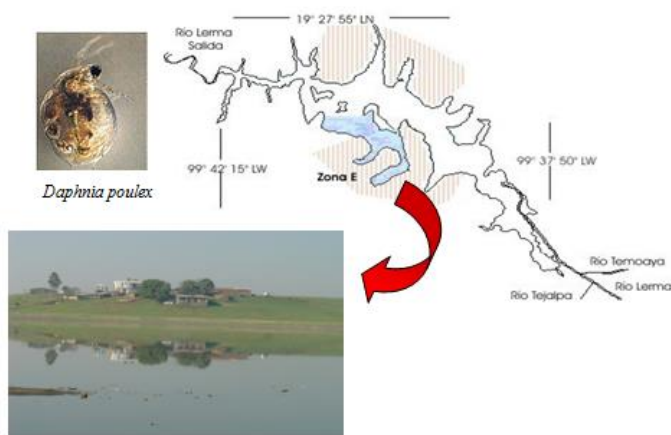


Fig. 1. Sección de la presa Alzate denominada Zona E.

En temporada de estiaje, el agua permanece durante más tiempo en esta zona E, alcanzando un mayor grado de depuración (Márquez, 2008). La condición de contaminación actual de la presa impacta negativamente a estos dáfidos que viven en una condición de estrés (Zarazúa, 2000). Los metales pesados son contaminantes que propician dicho problema, particularmente el cobre debido a la sensibilidad de la *Daphnia pulex* (Roux *et al.*, 1993), por lo cual se requiere de alguna técnica para la restauración de la zona y reiniciar la actividad económica de la población. La tecnología de restauración se está dirigiendo a métodos eficientes como la biorrestauración, esto es el uso de microorganismos o plantas para degradar, transformar o inmovilizar contaminantes (Fernández, *et al.*, 2004). Los metales pesados no son realmente destruidos por los microorganismos ni las plantas, pero pueden ser bioacumulados por éstas, por lo que el uso de vegetales es una opción tecnológica viable (Saygideger *et al.*, 2004, Fritioff *et al.* 2005). Para los metales pesados, los quelatos como el EDTA (Ácido etilendiamintetraacético) ayudan en la movilización y posterior acumulación de contaminantes, tales como plomo, cadmio, cromo, cobre, níquel, y zinc en varias especies de plantas (Blaylock *et al.* 1997; Turgut *et al.* 2004). A la fecha, los esfuerzos de fitorrestauración se han enfocado al uso de plantas (Gardezi; *et al.* 2003; Gardezi, 2007), en conjunto con los microorganismos presentes en la rizósfera, para acelerar la degradación de contaminantes orgánicos y para remover metales pesados de agua y suelo. La fitorrestauración está cobrando importancia debido a su relativo bajo costo y a su estética agradable al paisaje, comparado con las estrategias de restauración tradicionales (Peer, *et al.* 2005). El uso de plantas acumuladoras de metales es una técnica más limpia, simple, efectiva y aún de menor costo, en relación con los métodos fisicoquímicos (Hidalgo *et al.*, 2005). Existe una especie de planta acuática denominada *Lemna minor* L., que según Arroyavela, (2004), presenta características morfológicas y ecológicas útiles en el mejoramiento de la calidad ambiental de los ecosistemas acuáticos; es una planta perteneciente a la familia *Lemnaceae*, en la que no se diferencian el tallo y las hojas. Contiene una estructura plana y verde y una sola raíz delgada de color blanco su cuerpo mide sólo 0.6 mm de largo y 0.2 mm de ancho, y su fruto, que es el más pequeño del planeta, mide sólo 0.3 mm de largo y pesa 70 mg. Charlier *et al.* (2005) y Hou *et al.* (2007) han estudiado los efectos de metales traza sobre varias especies de plantas, entre ellas la *Lemna minor*, encontraron que ésta especie acumula metales traza en la raíz y hojas incrementando las concentraciones en los tejidos. Vázquez, (2008) estudió los efectos en la *Lemna minor* L. producidos por el cobre en forma iónica ( $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ) y acompañado con EDTA, por otro lado, Charlier *et al.* (2005) y Hou *et al.* (2007), estudiaron al Cu presente en aguas residuales para determinar las concentraciones en que ésta planta es apropiada para la

restauración, observaron que a concentraciones de 10 mg/L las condiciones de estrés de la planta se hicieron presentes provocando un deterioro muy fuerte en la planta. Pese a esto, la remoción de metales tóxicos por debajo de dichas concentraciones hacen a la *Lemna minor* propicia para la restauración, esto combinado con una buena administración de la cosecha de la planta. El cuerpo vegetativo de *Lemna minor* L. (lenteja de agua) sobrevive en aguas eutrofizadas y es una planta hiperacumuladora, según Zayed, (1998) por lo que puede presentar un alto potencial para la restauración de la zona, sin embargo, las diferentes especies químicas de cobre que se forman en el agua de la presa pueden modificar la capacidad de fitoextracción de esta planta. El conocer la selectividad de la *Lemna minor* L. (Kara, 2004) hacia distintas especies químicas de cobre y en conjunto con la protección de la *Daphnia pulex*, así como la contribución para la recuperación ambiental y económica de la zona, ha sido el objetivo principal de este trabajo de investigación.

## II. METODOLOGÍA

### A. Muestreo

Se recolectó *Lemna minor* L. de una laguna ubicada (figura 2), cerca de la presa José Antonio Alzate. Se midió *in situ* el pH y temperatura. Las bolsas con plantas recolectadas se colocaron en tinas con agua de la laguna y bolsas de gel para mantener la temperatura. La planta se lavó con agua desionizada para retirar insectos y algas que pudieran tener adheridos, y posteriormente se pesaron 65 gramos en base húmeda de la planta, suficiente para trasplantarse.



Fig. 2. Recolección de *Lemna minor* L.

También se muestrearon siete puntos en la zona E de la presa José Antonio Alzate, utilizando la técnica de mezcla compuesta, la recolección de agua en cada punto fue a 20 cm de profundidad. El agua fue almacenada en 13 bidones y se midieron *in situ* los siguientes parámetros con equipo de campo marca Corning previamente calibrado: pH, temperatura, conductividad, oxígeno disuelto y potencial redox. El agua fue transportada al laboratorio. Para la caracterización del agua se necesitó separar agua para realizar análisis de cationes y aniones. Para el análisis de cationes se utilizó un litro de agua con adición 1 ml de  $\text{HNO}_3$  grado suprapur (Merck) y se congeló para su conservación y posterior análisis. Para la determinación de aniones, se utilizó otro litro de agua filtrada a poro  $0.45 \mu\text{m}$  y de esta se extrajeron 30 mL que se filtraron a  $0.22 \mu\text{m}$ , para ambas filtraciones se utilizó un equipo Millipore y se congelaron para su conservación (Vázquez, 2008). Los aniones se determinaron mediante un cromatógrafo HPLC Shimadzu Modelo CDD-6A.

### B. Diseño de experimentos

Se realizó un diseño de experimentos factorial con tres factores 2x3x3 con ocho réplicas dando un total de 96 corridas utilizando 24 reactores (8 testigos). Se utilizaron 24 reactores con capacidad para 14 litros. Los reactores fueron distribuidos como se indica en la figura 3.

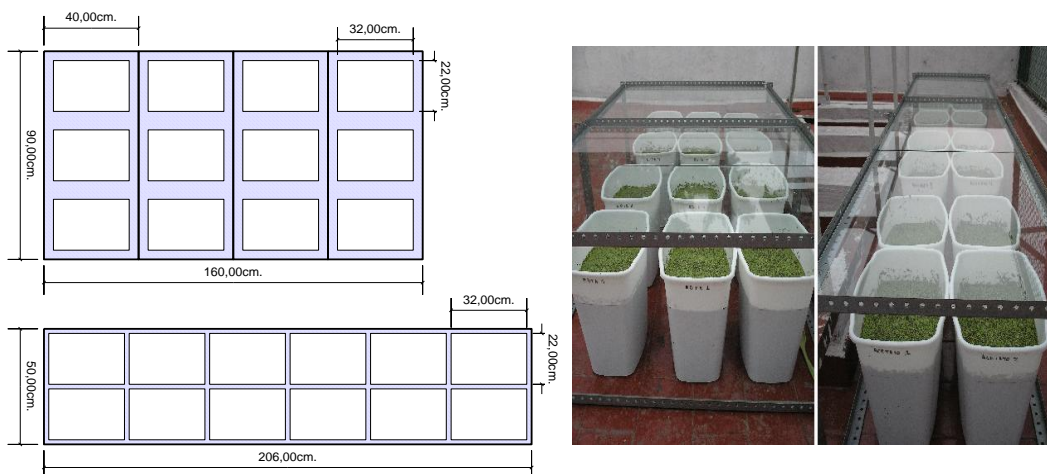


Fig. 3. Distribución de los reactores

A los reactores se les colocó una estructura metálica con cubierta superior de vidrio separada de 7 a 10 cm de la superficie del reactor para permitir el paso de luz solar y viento e impedir la intromisión de agua de lluvia y objetos extraños, como se representa en la figura 3. Además, se instaló una manguera conectada a una compresora para realizar la aireación periódica del agua de los mismos. Con base en los estudios de Zayed *et al.* (1998), en este proyecto se utilizó una concentración de 10 mg/L de  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  como acetato y Cu-EDTA, con el fin de determinar la selectividad de esta planta hacia estas diferentes especies químicas de cobre.

### C. Procedimiento de trabajo en los reactores

Para cuidar el contenido de nutrientes de los reactores se le añadió a cada bidón de 20 litros, 20 ppm de  $\text{KNO}_3$  (Baker) y 50 ppm de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Baker). Cuatro de 12 bidones se utilizaron como testigos, sin adición de cobre, a 4 bidones restantes se les añadieron 10 ppm por bidón de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , para el cobre iónico y 10 ppm de Cu-EDTA a los otros cuatro. El pH de todos los bidones fue ajustado a 6 con  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Baker). El agua de los bidones fue vaciada a los reactores llenando un volumen de 10 litros en cada uno, separándose en tres grupos: 8 reactores para testigos, 8 reactores con cobre iónico (acetato cúprico como  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ) y 8 reactores con cobre acomplexado (Cu-EDTA). Los reactores fueron monitoreados durante 0, 25 y 50 días, determinándose *in situ* el pH y la temperatura tres veces por semana; también se determinó la conductividad, oxígeno disuelto, y potencial redox, con ayuda de sensores conectados a una interfase marca Vernier, cada 14 días. Además se proporcionó aireación a todos los reactores cada tercer día, cuidando la evapotranspiración, rellenándose el volumen a 10 L con agua desionizada cada que se presentaba la evapotranspiración. Se recolectaron muestras de agua de cada reactor al inicio, medio y fin del experimento; conservándose en refrigeración para el análisis. Se realizó la cosecha de plantas al inicio, medio y fin del experimento, extrayéndose muestras representativas de cada reactor. Para la determinación de la concentración total y para la especiación del cobre disuelto cada muestra fue filtrada a  $0.45 \mu\text{m}$ , con un equipo Millipore. Se efectuó el análisis en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica Thermo Elemental modelo Solaar M6, por horno de grafito. El análisis de cloruros, nitritos, nitratos, sulfatos y fosfatos fue mediante un cromatógrafo HPLC Shimadzu con conductímetro y supresor de iones, medidas necesarias para la especiación química (Barceló *et al.*,

2005, Barceló, *et al.*, 2000, Barceló *et al.*, 1999) usando el programa MINEQL+ (Schecher y McAvoy, 1992). Las plantas se sometieron a un proceso de secado en una estufa MAPSA modelo HDP 433 a temperatura promedio de 55°C durante 3 días, posteriormente se realizó su calcinación en una mufla Thermoline modelo FURNATROL tipo 53600 a una temperatura de 500°C, en crisoles a peso constante. Se trataron las cenizas por digestión ácida en el horno de microondas con HNO<sub>3</sub> Suprapur. Se realizaron los análisis de Cu en las cenizas de la planta, por absorción atómica en horno de grafito. Una vez obtenidos las concentraciones de cationes y aniones, del agua de la zona E y de los reactores, se procedió a la determinación de la especiación disuelta del Cu en los reactores en forma aleatoria, durante los tiempos de cosecha, para determinar si hubo cambios en la forma química del [Cu(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup> y de Cu-EDTA, así como del [Cu(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup> inicial.

El índice de bioacumulación se calculó con la ecuación 1:

$$IB = \frac{\text{Metal en planta (mg.kg}^{-1}\text{)}}{\text{Metal en agua (mg.kg}^{-1}\text{)}} \quad (1)$$

Para conocer el metal en planta, se restó el Cu que contenía la planta en condiciones iniciales a la concentración de Cu en la planta (figura 4).

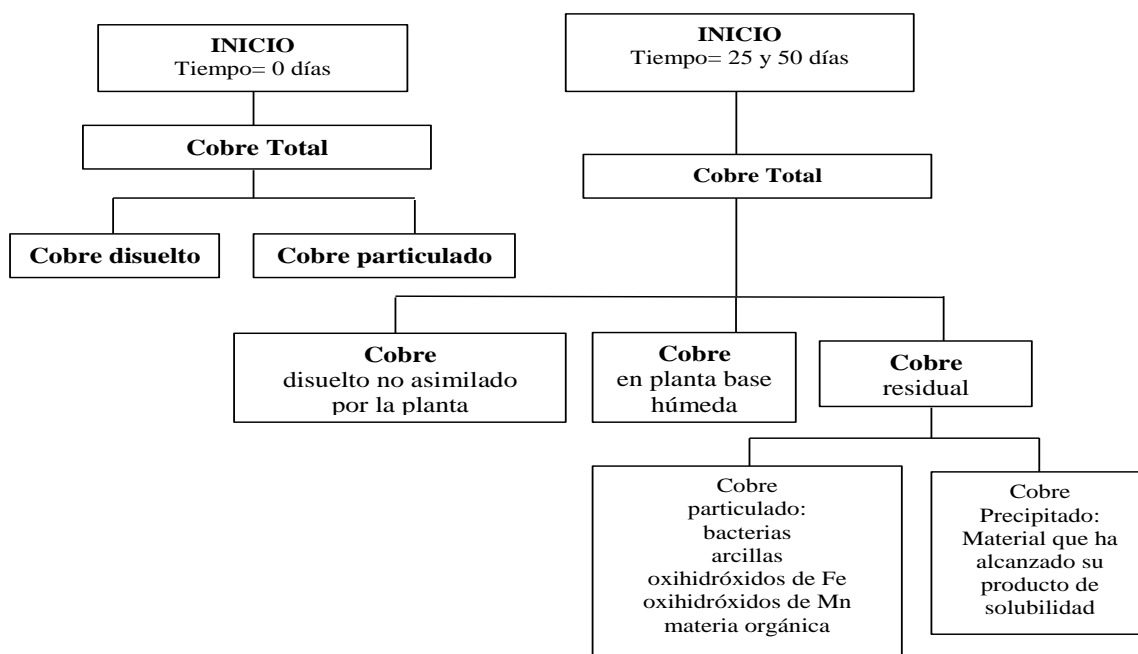


Fig. 4. Esquema del balance de masa para intervalos de tiempo de 0, 25 y 50 días

### III. RESULTADOS

#### A. Variación de parametros fisicoquimicos

Se observó un incremento del pH desde 6 hasta 8.8 durante el estudio, figura 5a. La temperatura se mantuvo casi estable, figura 5b.

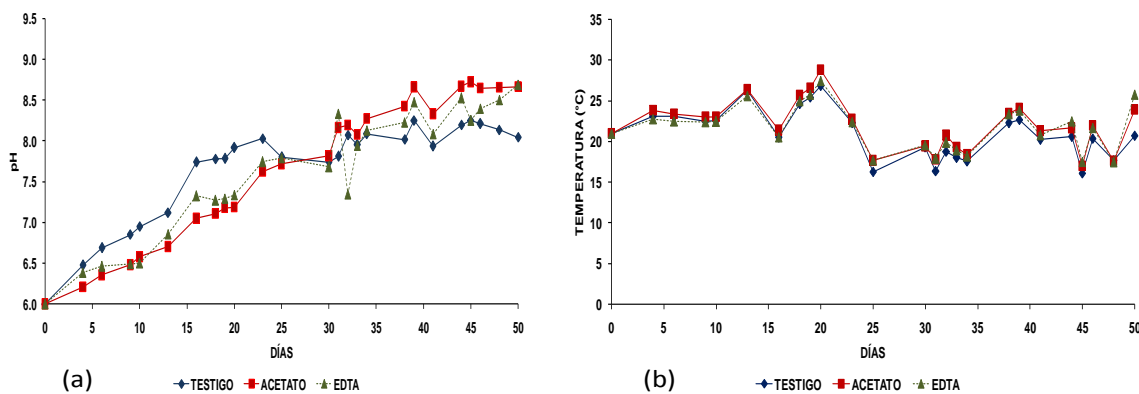


Fig. 5. (a) Variación del pH y (b) Variación de la Temperatura

La conductividad fue mayor en los reactores con Cu-acetato, Cu-EDTA y por último los testigos, figura 6a. El potencial redox mostró tendencia con pendiente negativa para los tres casos, figura 6b.

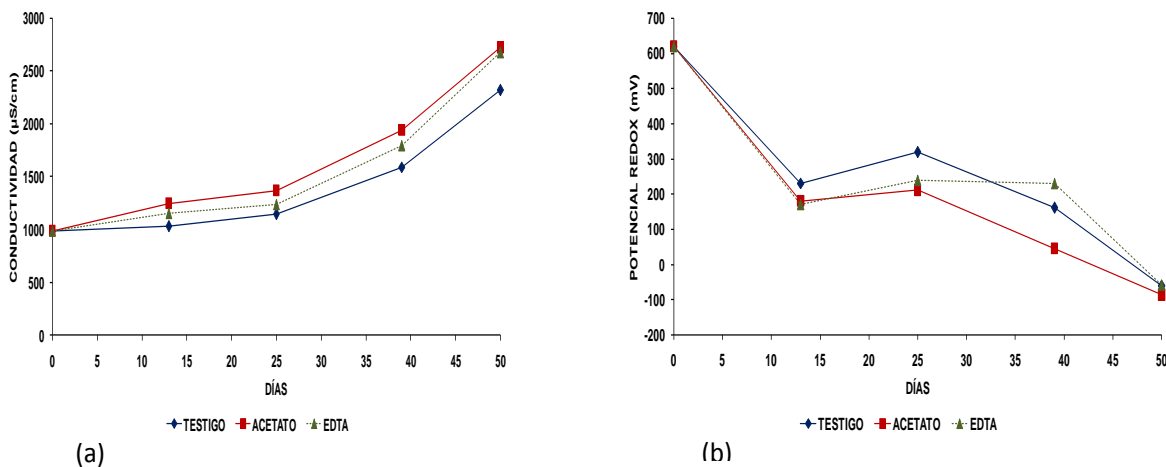


Fig. 6. (a) Variación de la conductividad y (b) Variación del potencial redox

En cuanto al O<sub>2</sub> disuelto se observó una rápida disminución del mismo, que se controlaba inyectando aire, figura 7.

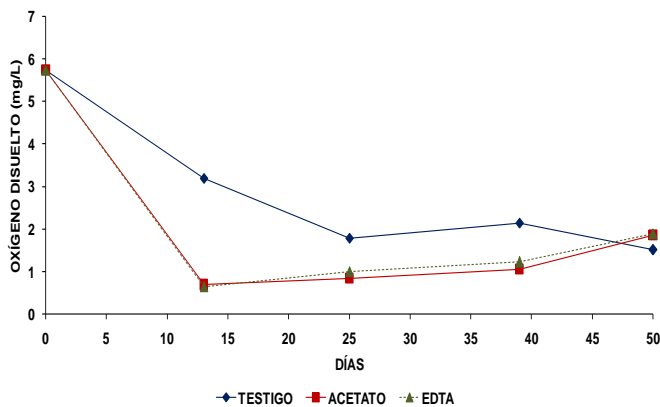


Fig. 7. Medición de oxígeno disuelto

Por otro lado el crecimiento de las algas incrementó y los niveles de oxígeno disuelto disminuyendo al tiempo en que las plantas mueren y son descompuestas por las bacterias aerobias. Es así que, el detrimento de los niveles de oxígeno disuelto es usualmente un indicador de intromisión de algún tipo de contaminante orgánico al cuerpo de agua. Los niveles de oxígeno disuelto variaron conforme la hora del día, el clima y la temperatura. El potencial redox y el O<sub>2</sub> disuelto están íntimamente relacionados, ya que a menor presencia de O<sub>2</sub>, se observaron valores menos positivos de E°, figura 2b. El volumen de agua en los reactores se mantuvo en 10 litros a lo largo del experimento, para minimizar el efecto de la evapotranspiración, los reactores fueron rellenados periódicamente con agua desionizada, impidiendo así afectar significativamente las concentraciones de los iones presentes.

*B. Medidas de Cobre total, disuelto y particulado*

Se midió el cobre total (Cu disuelto + cobre particulado), el cobre disuelto y el cobre particulado, respectivamente, para los tres tiempos de muestreo (0, 25 y 50 días), cuidando el pH y observándose una disminución en la concentración de cobre en el agua de los reactores en función del tiempo, se notó una diferencia entre la concentración de los reactores acetato y EDTA, siendo menor la de los primeros días y se notó un aumento en la concentración de cobre particulado. En las figuras 8, 9 y 10 se presentan los resultados del cobre total (Cu disuelto + cobre particulado), cobre disuelto y cobre particulado, respectivamente, que se obtuvieron para los tres tiempos de muestreo.

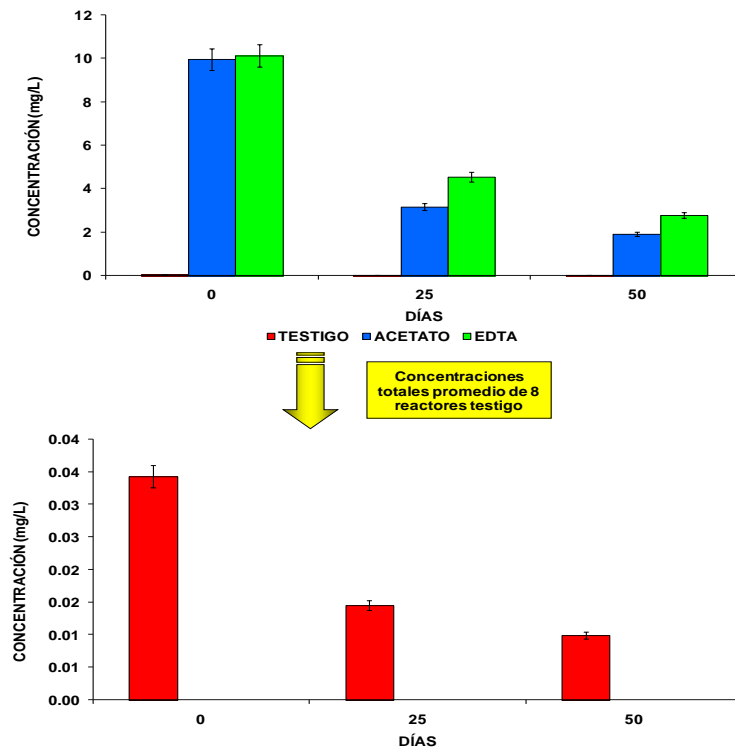


Fig. 8. Concentraciones de cobre total en función del tiempo

En las figuras 8, 9 y 10 se observa la disminución en la concentración de cobre total, disuelto y particulado en el agua de los reactores, disuelto en función del tiempo, notándose una diferencia entre la concentración de los reactores acetato y EDTA, siendo menor la de los primeros.

Según Kara (2004), la especie *Lemna minor* L. acumula grandes cantidades de cobre en los primeros días y posteriormente muestra una disminución en su acumulación tal vez debido a que se llega a su nivel de saturación; en las gráficas 9 y 10 se puede apreciar que entre el día 25 y 50, ya no existió una disminución notable en la concentración de cobre, además, el hecho de que aumenta el pH a regiones

alcalinas puede precipitar parte de él. En la figura 10 se presenta el Cu particulado y la curva de precipitación del Cu.

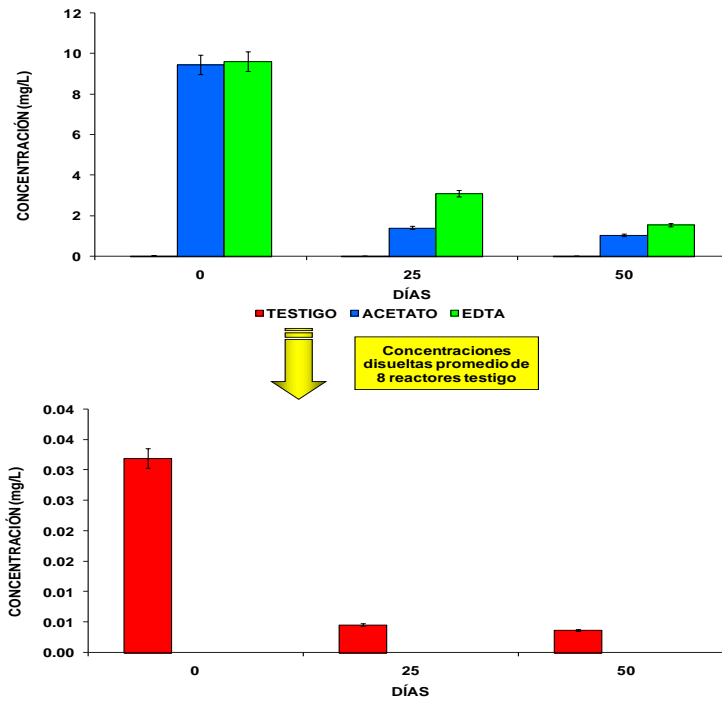


Fig. 9. Concentraciones de cobre disuelto en función del tiempo

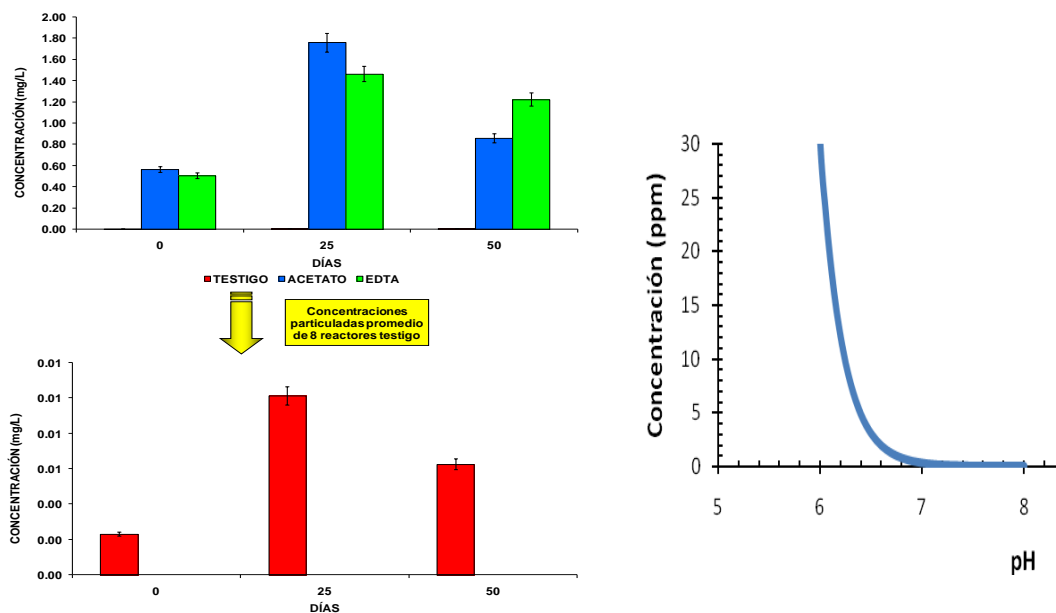


Fig. 10. Concentraciones de cobre particulado en función del tiempo



La figura 10 indicó un aumento en la concentración de cobre particulado, esto tal vez debido a que el cobre se ha adherido a bacterias, arcillas, materia orgánica u oxihidróxidos de Fe y Mn que incrementaron su tamaño a más de  $0.45\mu\text{m}$  y que ya no pasaron en el proceso de filtración.

### C. Especiación química del cobre y obtención del índice de Bioacumulación

Se determinó la especiación química para el cobre disuelto en los tres casos reactores testigo, acetato y EDTA respectivamente, en los tres tiempos de muestreo. En las figuras 11, 12 y 13 se indican los resultados de la especiación de Cu para los tres casos. Con los análisis de la planta y del agua se determinó, mediante un balance de masa, el índice de bioacumulación (IB) en la *Lemna minor* L para los tiempos de cosecha. El comportamiento del pH está relacionado con el efecto fotosintético microalgal y de la *Lemna minor*, pues al aumentar éste se eleva el consumo de  $\text{CO}_2$ , lo que trae en consecuencia la alcalinización del medio (Barrera 2008). Kayombo *et al.*, 2003, en estudios sobre crecimiento heterotrófico de las microalgas y de materia orgánica por detritus, observó también la tendencia al aumento en el pH, esto confirma la relación con el consumo de oxígeno debido a la muerte de plantas y a la degradación bacteriana de materia orgánica en los reactores generando la presencia de una posible hidrólisis básica. El comportamiento en la conductividad indicó mayor presencia de iones en el reactor de acetato de cobre. Al ser la conductividad eléctrica una medida de la actividad iónica de una solución en términos de su capacidad para transmitir corriente y al ser el Cu-acetato una sal muy soluble, permite en el agua que exista prácticamente  $\text{Cu}^{2+}$  disuelto, además de los iones como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ , etc., lo que explica el porqué de este comportamiento en los reactores, además de que muchas de las sales no han alcanzado su producto de solubilidad para poder precipitar. Las figuras 11, 12 y 13 muestran los resultados de la especiación de Cu para los reactores testigo, acetato y EDTA respectivamente en los tres tiempos de muestreo. Se puede observar para cada caso cual es la especie dominante en el tiempo 0, siendo  $\text{CuHCO}_3^+$  para el testigo y para el acetato, y Cu EDTA para los reactores EDTA. También se observa que el  $\text{Cu}^{2+}$  ( $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ) y el  $\text{CuHCO}_3^+$  son absorbidos con mayor facilidad que las demás especies y que en los reactores acetato, el Cu iónico se encuentra en mayor concentración. Por otro lado, en los reactores EDTA, el cobre iónico no se encuentra tan disponible debido a que está formando un quelato, que es una forma más estable y además es el que disminuye con mayor lentitud. Por otro lado el comportamiento en el potencial redox indica un proceso oxidativo en el sistema, generando que el sistema acuático presente con el tiempo valores de E (potencial eléctrico) menos positivos hasta negativos, presentándose ambientes cada vez reductores, es decir tendencia a la anoxia. Las reacciones óxido-reducción variaron a lo largo del día conforme la respiración y la fotosíntesis incrementan y disminuyen. Además los procesos de pérdida de oxígeno de las sales oxigenadas como los nitratos, donde pudiera presentarse efectos de desnitrificación, así como reducción de Mn (IV) y Fe (III).

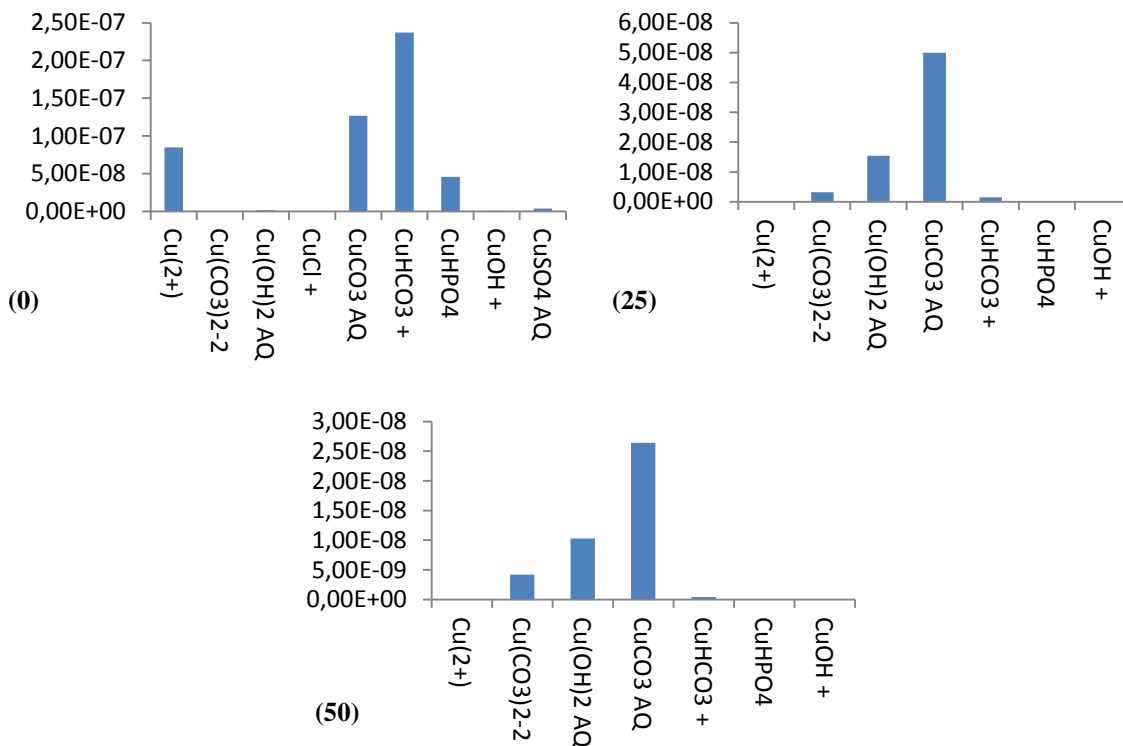


Fig. 11. Especiación de Cu proveniente del agua de la presa en reactores testigo en tiempo 0, 25 y 50 días. Concentraciones en (mol/L)

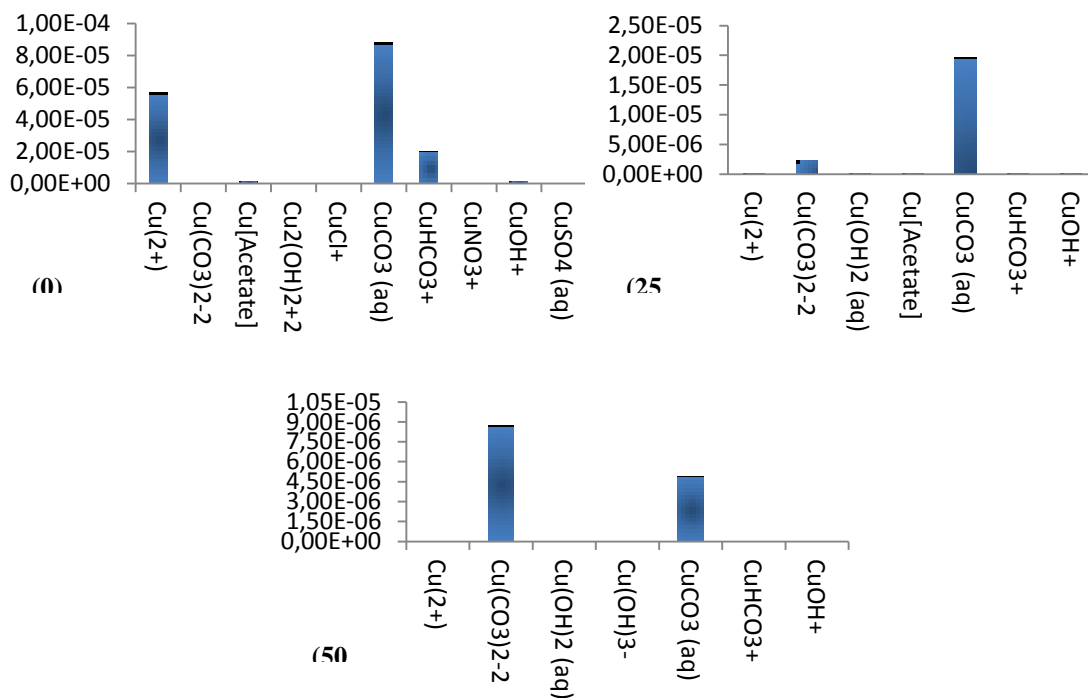


Fig. 12. Especiación de Cu iónico (acetato de cobre) en reactores con tiempos 0, 25 y 50 días. Concentraciones en (mol/L)

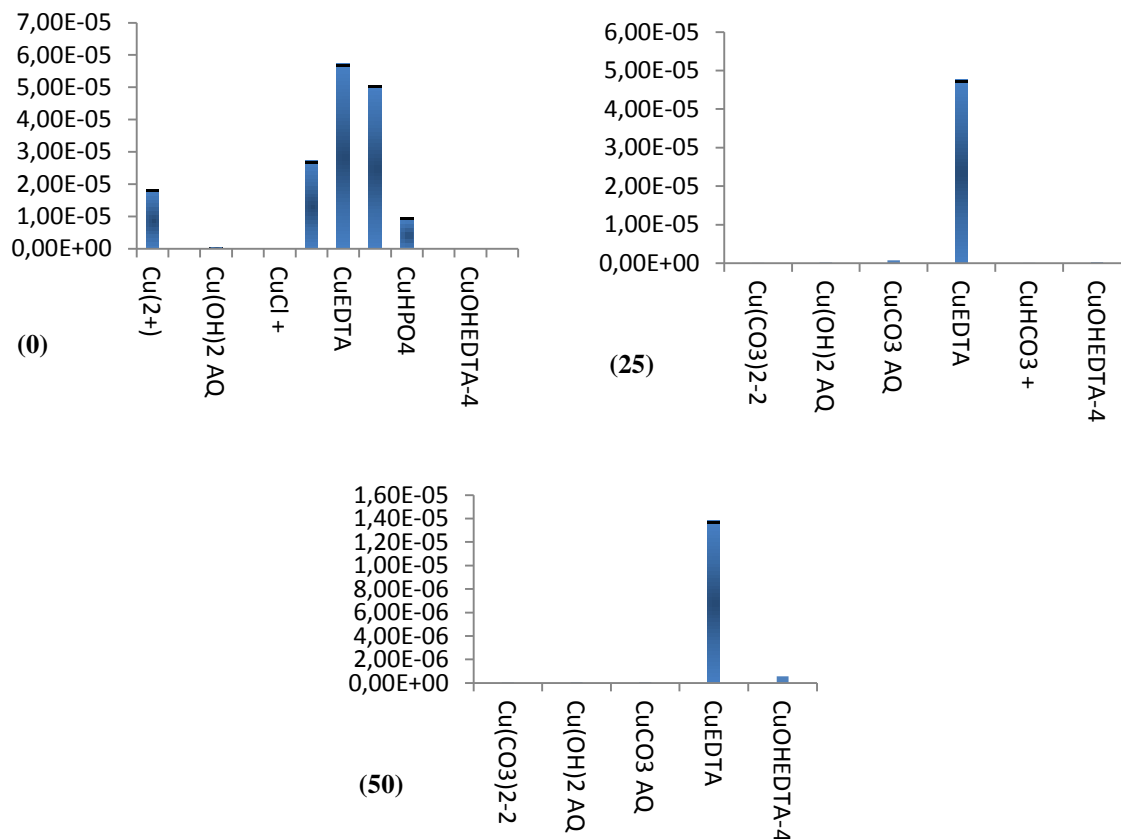


Fig. 13. Especiación de Cu-EDTA en reactores con tiempos 0, 25 y 50 días. Concentraciones en (mol/L)

Los valores de potencial redox por encima de 400 mV son dañinos para la vida acuática (Vazquez, 2008). Idealmente se deben obtener valores entre 300 y 390 mV, los valores por debajo de 300 mV no son recomendables. El oxígeno disuelto durante los 50 días mostró niveles de oxígeno mayores para el caso de los reactores testigo; se notó que los niveles fueron muy similares para los reactores con Cu-acetato y Cu-EDTA; ambos fueron menores que el testigo debido a la mayor descomposición de plantas provocada por la acción tóxica del cobre. Se obtuvo la concentración de cobre en la planta base húmeda y base seca al inicio, medio y final del experimento, donde se observaron los resultados que se muestran en las figuras 14a y 14b.

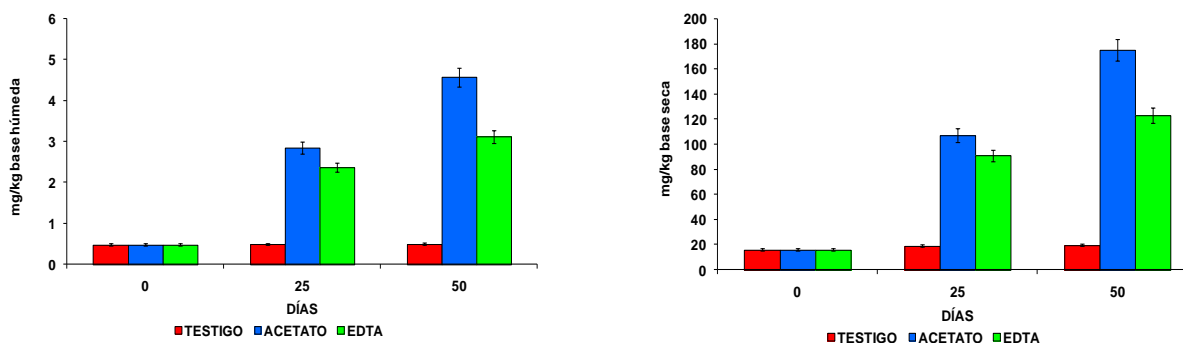


Fig. 14. (a) Concentraciones de Cu en la planta en base húmeda, (b) en base seca a los 0, 25 y 50 días

El comportamiento de la planta en cuanto a la acumulación de cobre en un tiempo relativamente largo en comparación con otros estudios, indica que en los primeros 25 días la planta bioacumula metal en grandes cantidades, concordando con lo que reporta Kara (2004), esto utilizando CuSO<sub>4</sub>. La planta muestra mayor afinidad hacia el Cu-acetato, es decir [Cu(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup> disuelto, en comparación con el cobre-EDTA; aunque la planta bioacumula las dos especies en una buena proporción, durante los 50 días de experimento. Se observa la necesidad de realizar más estudios para conocer el nivel de saturación de la *Lemna minor* L. con distintas concentraciones de cobre para poder determinar los tiempos óptimos de cosecha.

*D. Análisis estadístico*

Se realizó un análisis de varianza para un diseño de experimentos factorial con tres factores para la concentración de cobre en agua y planta medida en mg/kg base húmeda, para determinar los factores que tienen un efecto estadísticamente significativo en la concentración a través de pruebas F mediante el software STATGRAPHICS Plus. Los factores y niveles de los factores fueron como se indica en la tabla I.

Tabla I. Factores y niveles resultantes del diseño de experimentos

Tipo de especie química de cobre	Medio	Tiempo del experimento
Cu-Acetato (para [Cu(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ] <sup>2+</sup> , la sal es muy soluble	En agua y en la planta	Inicio
Cu-EDTA, Cu acomplexado	En agua y en la planta	Medio
		Fin

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de la concentración en las contribuciones debidas a los distintos factores. Los valores-P prueban la diferencia estadísticamente significativa de cada uno de los factores, tabla II.

Tabla II. Análisis de varianza para la concentración de cobre

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Prueba F	Valor-P
<b>Efectos principales</b>					
A: Tipo de cobre	310.86	1	310.86	47.62	0.0000
B: Medio	40987.4	1	40987.4	6279.33	0.0000
C: Tiempo	30228.0	2	15114.0	2315.49	0.0000
<b>Interacciones</b>					
AB	431.822	1	431.822	66.16	0.0000
AC	254.634	2	127.317	19.51	0.0000
BC	34959.2	2	17479.6	2677.90	0.0000
Residual	561.352	86	6.52735		
TOTAL	107733.0	95			

Como los seis valores-P fueron menores a 0.05, todos los factores tienen una diferencia estadísticamente significativa en el efecto de la concentración a un nivel de confianza del 95%; sin embargo, era de esperarse que la concentración variara a lo largo del factor tiempo, también se esperaba que fuera distinta entre el factor medio, la concentración en agua y en planta, pero es de resaltar que se prueba estadísticamente que existe diferencia en el factor tipo de cobre iónico (Cu- acetato) y Cu-EDTA, figura 15.

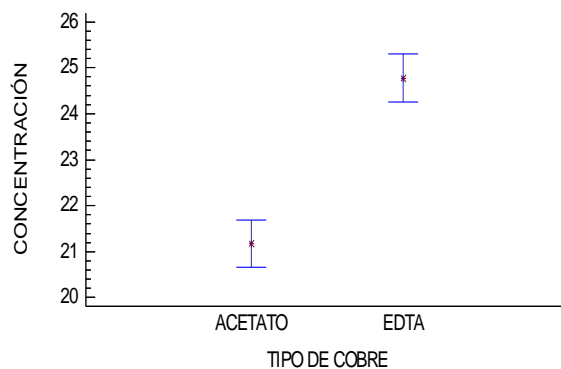


Fig. 15. Valores medios con intervalos de diferencia mínima significativa (LSD) del 95%

En la tabla III se determinó que valores medios son significativamente diferentes. La parte superior de la tabla identifica los grupos homogéneos, marcando con X en la misma columna a los valores medios que forman un mismo grupo entre el cual no hay diferencia estadísticamente significativa; para este caso, las X están en columnas distintas. La parte inferior de la tabla muestra la diferencia estimada entre el par de valores medios del factor tipo de cobre para sus niveles de acetato y EDTA, y coloca un asterisco para indicar que existe una diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95%.

Tabla III. Pruebas de intervalo múltiple para concentración por tipo de cobre

Método: 95% LSD				
Tipo de cobre	Conteo	Media	Sigma	Grupos homogéneos
Acetato	48	21.1771	0.368764	X
EDTA	48	24.7761	0.368764	X
Contraste			Diferencia	+/- Límites
Acetato-EDTA			*- 3.59896	1.03673

\*denota diferencia estadísticamente significativa

### E. Determinación del Índice de Bioacumulación

La figura 16 muestra los resultados del cálculo de IB para cada caso, que se realizó considerando la concentración total de Cu en los reactores.

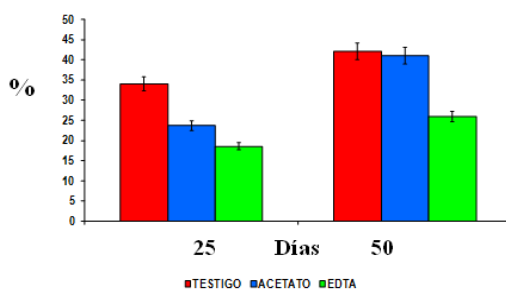


Fig. 16. Índices de Bioacumulación de cobre en % por la Lemna minor L. para cada caso, Cu-testigo, Cu-acetato y Cu-EDTA en tiempos de 25 y 50 días

En la figura 16, se puede observar que el cobre en los reactores testigo fue más fácilmente asimilada por la planta, coincidiendo con lo obtenido en la figura 8, donde se observa como rápidamente desaparece a los 25 y 50 días, es importante indicar que a bajas concentraciones las plantas estuvieron lozanas, lo que significa que no son intoxicadas a bajas concentraciones de cobre. Se puede observar por

la especiación que el ion disuelto  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  es el primero en ser asimilable (figura 11), seguido por las especies  $[\text{CuHCO}_3]^+$  y  $\text{CuHPO}_4$  en la solución acuosa.

En el caso de los reactores adicionados con acetato de cobre (Cu iónico:  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ), donde existe una relación de 10 mg/L de  $\text{Cu}^{2+}$ , se observó según la especiación una asimilación menos rápida que en los reactores testigo, donde cabe aclarar que las plantas empezaron a amarillarse a los 25 días, aunque fueron asimilando cobre disuelto (figura 12), donde desaparece rápidamente, respecto al inicio, de nuevo las especies asimiladas fueron  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ,  $[\text{CuHCO}_3]^+$  y  $\text{CuHPO}_4$ , es importante mencionar que los carbonatos son ligeramente asimilados, así como los sulfatos. A los 50 días estas especies prácticamente fueron asimiladas, tomando la planta más cobre de otras especies como los mismos carbonatos, que se empezaron a formar al aumentar el pH, aunque las plantas se amarillaron aún más y fueron muriendo, afectando al oxígeno disuelto, volviendo anóxico el ambiente acuoso.

Para el caso de los reactores adicionados con cobre acomplejado con EDTA (Cu-EDTA), también se adicionaron 10 mg/L de  $\text{Cu}^{2+}$ , se observó en la especiación una asimilación más lenta que en los reactores Cu-Acetato, por lo tanto aún más lenta respecto a los reactores testigo, las plantas también se tornaron amarillas a los 25 días, aunque fueron asimilando cobre disuelto (figura 13), donde desapareció primero la especie química  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ , de nuevo  $[\text{CuHCO}_3]^+$  y  $\text{CuHPO}_4$ , pero a diferencia con Cu-acetato, el Cu-EDTA, fue asimilándose lentamente, disminuyendo desde  $5.8 \times 10^{-5}$  mol/L (23.87 mg/L), considerando todo el compuesto Cu-EDTA a  $4.8 \times 10^{-5}$  mol/L (19.77 mg/L) a tiempo cero y  $1.29 \times 10^{-5}$  mol/L (5.31 mg/L) a los 50 días.

Lo interesante de la especiación es que demuestra la presencia de dos especies Cu-EDTA, la conocida y una interaccionada con la especie  $\text{CuOH}$ , donde el cobre presenta estado de oxidación I ( $\text{Cu}^+$ ), que es el complejo  $\text{Cu}(\text{OH})\text{-EDTA}$ , donde a medida que el agua va perdiendo oxígeno, aumenta esta especie química. Aquí se refleja la importancia de la especiación química. Finalmente considerando la asimilación del  $\text{Cu}^{2+}$  por la *Lemna Minor* L., se puede inferir un orden:

Cu-acetato > Cu-EDTA

Donde el Cu-ac, permite que el cobre se encuentre en una concentración mayor como cobre iónico. Debido a la misma morfología de la planta que solamente contiene fronde y raíz, como se indica en la figura 17, por lo que se considera una planta hiperacumuladora, pudiendo absorber a través de su corta raíz y paso casi directo al fronde, el cobre iónico y Cu-EDTA, por ser de radio mucho más pequeño el cobre iónico que el Cu-EDTA, la velocidad de absorción es más rápida.

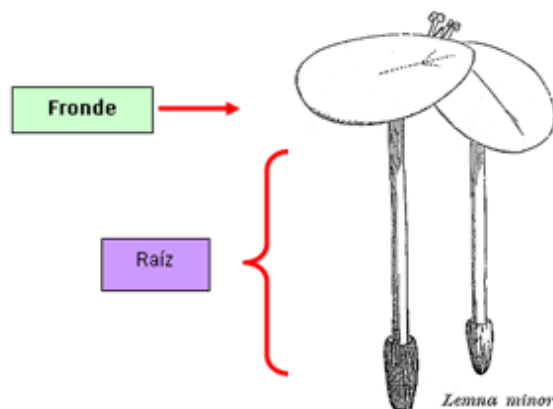


Fig. 17. Características de la especie *Lemna minor* L.

Por otro lado, Graham, 1979, tomado del compendio Lepp, 1981, estudió que los aminoácidos en las paredes celulares de la planta, es decir los nitrógenos (bases de Lewis), permiten acomplejar al  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  más rápido, intercambiando los ligandos agua para formar un quelato con el aminoácido (figura 18). Por otro lado el Cu-EDTA, ya de por sí está quelatado y será más difícil el intercambio.

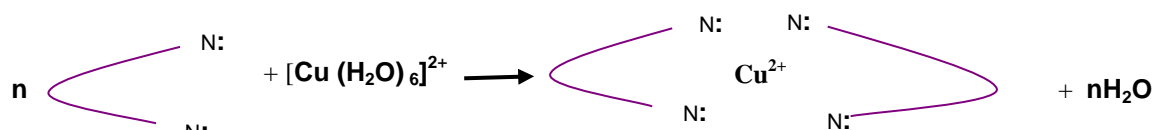


Fig. 18. Complejamiento del  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  con aminoácidos

#### IV. CONCLUSIONES

En función de los valores obtenidos de la conductividad, se observó una disolución alta de iones y una tendencia a disminuir del potencial redox, relacionado con la disminución del oxígeno disuelto, aunque el agua de los reactores en general no llegó realmente a una etapa anaerobia completa. En cuanto a la relación de Cu iónico y Cu quelatado con EDTA, la planta aparentemente asimiló más a la especie iónica, aunque en las gráficas iniciales no fue tan marcado, ya que existió una asimilación también del Cu-EDTA. Se notó una disminución muy marcada del cobre a los 50 días, sin embargo se cree que no todo es asimilación por parte de la planta, ya que al aumentar el pH pudo existir una parte de Cu precipitado. A los 50 días se observó una tendencia a aumentar el cobre particulado, que se puede deber al proceso de sedimentación, sobre todo al formar material detrítico por la muerte de plantas, algas, bacterias, etc., e incluso considerando el mismo proceso de sedimentación al flocular material coloidal. Al efectuar la especiación química mediante el paquete computacional MINEQL+, se pudo justificar con más precisión el comportamiento de asimilación de  $\text{Cu}^{2+}$  por la *Lemna minor* L. El resultado final del análisis de resultados, permitió llegar a la conclusión de que se lograron buenos índices de bioacumulación, tanto de cobre-acetato (cobre iónico por la alta solubilidad de esta sal) y del Cu-EDTA. Se puede concluir un orden: Cu-ac > Cu-EDTA respecto a la asimilación del cobre por la planta.

#### RECONOCIMIENTOS

Se le agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa del Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) a través de la Red de Tecnología del Agua de Cuerpos Académicos.

#### REFERENCIAS

- Arroyavela M. del P. (2004). LENTEJA DE AGUA (*Lemna minor* L.): Una planta acuática promisoría. Revista EIA, ISSN 1794-1237 Número 1 p. 33-38. Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colombia)
- Atlas 2010. Atlas de la Cuenca del Río Lerma en el estado de México (Compendio). Secretaría del Agua y Obra Pública y la Comisión Coordinadora para la recuperación Ecológica de la Cuenca del Río Lerma. ISBN: 968-484-655 (Colección Mayor) y el ISBN: 978-607-495-153-0. Número de autorización del Consejo Editorial de la administración Pública Estatal CE:206/02/11.
- Ávila, P. P., (2001). Dinámica de metales pesados no esenciales en la interacción agua-sedimento-biota de la presa J. A. Alzate. Tesis doctoral, Centro Interamericano de Recursos del Agua de la Facultad de Ingeniería, UAEM., Toluca, Méx. pp: 1-176.

- Barceló I., Solís H., González C., Bussy A.L., Ávila P., García J., (1999). Determinación experimental de las especies de Fe, Mn y Cu en el agua de la presa J.A. Alzate, Edo. de México, Sociedad Química de México, **43**:43-49.
- Barceló I., Solís H., González C., Ávila P., García J., (2000a). Determination of cadmium and lead species in the water column of the J.A. Alzate reservoir, México. *Environment. Wat. Res.*, **72**:132-140.
- Barceló-Quintal I.D (2000b). Estudio de la Movilidad de Ca, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn en Sedimentos de la Presa José Antonio Alzate en el Estado de México. Tesis doctoral, Centro Interamericano de Recursos del Agua de la Facultad de Ingeniería, UAEM., Toluca, Mex. pp: 1-278.
- Barceló Q.I.D., Bussy B. A.L. Solís C.H.E, (2005). Cap.10 en Applications of analytical chemistry in environmental research, pp. 161-188, ISBN: 81-308-0057-8, Ed. Manuel Palomar, Editorial Research Signpost, India.
- Barceló-Quintal I.D., Solís-Correa H. E., Ávila-Pérez P., López-Galván E., Gómez-Salazar S., García-Albortante J. (2012). Determination of Distributions of Cd, Cu, and Pb Concentrations in Sediments of a Mexican Reservoir to Infer Their Environmental Risk. *Biol Trace Elem Res* **148**:122–132.
- Barceló-Quintal I.D., Salazar-Peláez M. L, García-Albortante J., Domínguez-Mariani E., Ulrico López-Chuken U.J., Sergio Gómez-Salazar S. (2013). Evaluation of Water Quality Index in Lerma River Upper Basin. *Journal of Environmental Protection* **4** (7): 98-103.
- Barrera B.C., Vazquez G, Barceló Q. I., Bussy A.L., (2008). Microalgal dynamics in batch reactors for municipal wastewater treatment containing dairy sewage water. *Water, Air, & Soil Pollution* **190**, 1-4, 259-270.
- Blaylock M, Salt D, Dushenkov S, Zakharova O, Gussman C, Kapulnik Y, Ensley B, Raskin I (1997) Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environ Sci Technol* **31**:860-865.
- Charlier Jr, H. A.; C. Albertson, C. Thornock, L. Warner, T. Hurst, R. Ellis (2005). Comparison of the effects of arsenic (V), cadmium (II), and mercury (II) single metal and mixed metal exposure in radish, *Raphanus sativus*, *Fescue grass*, *Festuca ovina*, and *Duckweed*, *Lemna minor*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **75**: 474-481.
- Comisión Nacional del Agua. CNA (1993). Actualización de la información de los acuíferos del alto Lerma (valles de Toluca e Ixtlahuaca, Edo. de México), y la adaptación de su modelo DAS al lenguaje basic. Documento de la DGCOH. México. S.n.p.
- Fernández, J.; Beascoechea, F.; Muñoz, J.; Curt Fernández de la Mora, M. (2004) Manual de fitodepuración. Filtros de macrófitas en flotación. Universidad Politécnica de Madrid.
- Fritioff, A., Kautsky, L. y Greger, M. (2005). Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants. *Environmental Pollution* **133**: 265-274.
- Gardezi A.K.; Barcelo, I. D.; Cetina, V. M.; Bussy, A. L.; Borja, M. A., Larqué, M. (2003). Preliminary studies of phytoremediation by *Leucaena leucocephala* in association with arbuscular Endomycorrhiza and *Rhizobium* in soil polluted by Cu<sup>2+</sup> and Cr. *Proceedings of the 7th World Multiconference on Systemics, Cybernetics and informatics*, Orlando Florida, USA. Vol. XIV: pp. 6-11.
- Gardezi, A. K. (2007). Absorción de Cu y Cr por *Leucaena leucocephala* mediante la aplicación de endomicorizas arbusculares y rhizobium en un suelo contaminado. Tesis doctoral, Instituto Tecnológico de Toluca.
- Graham R.D. (1979). Transport of copper and manganese to the xilem exudate of sunflower. *Plant, Cell and Environment*. **2**: 139-142. Leep, N. W. (1981). Effect of heavy metal pollution on plants. Ed. N. W. Leep, *Pollution Monitoring Series*. pp: 111-143.
- Kara, Y. (2004). Bioaccumulation of copper from contaminated wastewater by using *Lemna minor*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **72**: 467-471.



- Kayombo S., Mbwette T.S.A., Katima J.H.Y, Jorgensen S.E., (2003). Effects of substrate concentrations on the growth of heterotrophic bacteria and algae in secondary facultative ponds. *Water Research*, **37** (12): 2937-2943.
- Peer W. A., Baxter I.R., Richards E. L., Freeman J. L., Murphy A. S. (2005) Phytoremediation and hyperaccumulator plants. Center for Phytoremediation, Purdue University, West Lafayette, IN 47907 USA.
- Roux D. J.; Kempster P. L.; Truter E.; Van Der Merwe L., (1993). Effect of cadmium and copper on survival and reproduction of *Daphnia pulex* **19** (4): 269-274
- Saygideger, S.; Dogan, M. (2004). Lead and Cadmium Accumulation and Toxicity in the Presence of EDTA in *Lemna minor* and *Ceratophyllum demersum* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 73, 182-789
- Schecher, W.D. and D.C. McAvoy (1992). MINEQL+ (A Software Environment for Chemical Equilibrium Modeling, Computers, Environment and Urban Systems), **16** (1): 65-76.
- Turgut C, Pepe K .M., Cutright T. J. (2004) The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environ Pollution* **131**:147-154
- Vázquez Z.C. (2008). Determinación de la capacidad de fitoextracción de especies químicas de Cu (II), por la *Lemna minor* L. en agua de una zona de la presa José Antonio Alzate. Tesis de Maestría, División de Ciencias Básicas e Ingeniería de Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco.
- Zarazúa, G. (2000). Bioacumulación y toxicidad de los metales pesados Cr, Cu, Zn, Cd y Hg en *Daphnia pulex* de la presa José Antonio Alzate, Estado de México. Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de México
- Zayed, A. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality* **27** (3): 715-721