

00381
26
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO SOBRE ABSORCIÓN DE PLOMO POR
Lemna gibba L.: CAMBIOS BIOQUÍMICOS BÁSICOS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

P R E S E N T A
M. en C. MARIA GUADALUPE MIRANDA ARCE

23954 M

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS: DR. KUPPUSAMY ILANGO VAN

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION

DISCONTINUA

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|--|--------|
| RESUMEN | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN | 2 |
| I.1 Justificación | 5 |
| I.2 Objetivo general | 6 |
| I.2.1 Objetivos específicos | 7 |
| I.1.3 Hipótesis de trabajo | 7 |
| II. ANTECEDENTES | 8 |
| II.1 Generalidades de metales pesados | 8 |
| II.2 Generalidades del Pb y fuentes de contaminación | 12 |
| II.2.1 En el ambiente ocupacional | 14 |
| a) Minería y fundición | 14 |
| b) Industria | 15 |
| II.2.2 En el ambiente en general | 16 |
| a) Aire | 16 |
| b) Agua | 19 |
| c) Suelo | 20 |
| d) Alimentos | 20 |
| e) Tabaco | 21 |
| f) Otras fuentes | 22 |
| II.3 Absorción de metales pesados por las plantas y su toxicidad | 23 |
| II.3.1 Mecanismos de resistencia a la toxicidad por metales pesados en las plantas | 31 |
| II.4 Contaminación por Pb en los ambientes naturales y sus efectos en la biota acuática | 35 |
| II.5 Efectos clínicos del Pb | 38 |
| II.6 Macrofitas acuáticas en la remoción de metales pesados y otros compuestos de aguas contaminadas. | 38 |
| II.7 Características botánicas, anatómicas y distribución mundial de <i>Lemna gibba</i> L. | 42 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 47 |
| III.1 Diseños de experimentos | 48 |
| III.1.1 Efecto de la concentración del Pb sobre la viabilidad de <i>Lemna gibba</i> (experimento 1). | 48 |
| III.1.2 Efecto del periodo de iluminación sobre el crecimiento y adaptación de <i>Lemna gibba</i> a la presencia del Pb en el medio (experimento 2). | 48 |
| III.1.3 Efecto de la concentración de nutrientes sobre el crecimiento de <i>Lemna gibba</i> bajo diferentes concentraciones de Pb (experimento 3). | 49 |

| | | |
|---------|--|----|
| III.1.4 | Efecto del Pb sobre algunos componentes bioquímicos del metabolismo intermediario (experimento 4). | 49 |
| III.2 | Métodos analíticos. | 49 |
| III.2.1 | Cuantificación de la concentración de Pb. | 50 |
| III.2.2 | Extracción de azúcares, aminoácidos y fenoles. | 50 |
| III.2.3 | Cuantificación de azúcares libres totales. | 50 |
| III.2.4 | Cuantificación de aminoácidos libres totales. | 51 |
| III.2.5 | Cuantificación de fenoles totales. | 51 |
| III.2.6 | Cuantificación de almidón soluble total. | 51 |
| III.2.7 | Cuantificación de proteínas solubles totales. | 52 |
| III.2.8 | Cuantificación de clorofila. | 52 |
| III.3 | Técnicas histoquímicas | 53 |
| III.4 | Métodos numéricos | 54 |
| III.4.1 | Medición de la tasa de crecimiento relativo (R). | 54 |
| IV. | RESULTADOS | 55 |
| IV.1 | Experimento 1 | 55 |
| IV.2 | Experimento 2 | 58 |
| IV.3 | Experimento 3 | 65 |
| IV.4 | Experimento 4 | 66 |
| IV.5 | Estudio histoquímico | 72 |
| V. | DISCUSIÓN | 73 |
| VI. | CONCLUSIONES | 82 |
| VII. | BIBLIOGRAFÍA | 84 |
| | ANEXO | |

RESUMEN

Se probó la capacidad de la macrofita acuática *Lemna gibba* en la remoción de Pb a nivel de invernadero, con concentraciones desde 2 hasta 500 ppm, habiéndose encontrado que a las 72 h de inoculación se presenta la absorción máxima. El Pb se agregó en forma de nitrato; hubo precipitación de éste al aplicarlo al medio nutritivo, por lo que se recurrió a hacer diluciones, encontrando que la más adecuada fue de 1:40.

El efecto del periodo de iluminación resultó significativo tanto para la tasa de crecimiento como para la velocidad de absorción de Pb, que se absorbe más rápidamente en luz discontinua (12 h luz- 12 h oscuridad). El contenido de clorofila total se reduce un 49%, la clorofila a en 45.2% y la clorofila b en 52.5%, bajo la influencia del Pb en luz discontinua, mientras que en luz continua el efecto se enmascara con la elevación de los valores de clorofila en los tratamientos experimentales por arriba del testigo sin Pb.

Los cambios bioquímicos en la planta por efectos del metal se manifestaron con el incremento de fenoles en un 22%; un incremento en los precursores primarios: azúcares libres de 41.6% y aminoácidos libres de 174%; además de un decremento en el almidón soluble en un 80% y en las proteínas solubles en 95.4%.

Las tinciones en los cortes histológicos revelaron concordancia con los estudios bioquímicos encontrándose que tanto las proteínas y el almidón disminuían conforme se aumenta el Pb, mientras que los fenoles se hacen más evidentes.

De los resultados de este estudio se propone que *Lemna gibba* se utilice en el tratamiento terciario de agua residual para remover Pb, con la sugerencia de cosechar las hidrófitas a las 72 h de la inoculación para evitar los efectos de toxicidad del Pb en las plantas y la reversión del metal al agua.

ABSTRACT

Ability of aquatic macrophyta *Lemna gibba* (duckweed) to remove Pb was proved in a greenhouse using concentrations from 2 to 500 mg/L. Maximum absorption was found within 72 h of inoculation; Pb was added in the form of nitrate, precipitation occurred when applied to the nutritive medium so dilutions were performed until the most proper was found to be 1:40.

The light period effect was meaningful for the growth rate and Pb absorption velocity, that is absorbed faster with discontinuous light (12 h light - 12 h darkness). Under the influence of Pb with discontinuous light total content of chlorophyll is reduced to 49%, chlorophyll a to 45% and chlorophyll b to 52.5% whereas the effect is masked with continuous light increasing chlorophyll values in treatments above the control without Pb.

Biochemical changes in the plant due to this metal were appreciated through the increase of 22% of phenols and primary precursors like free sugars 41.6% and free aminoacids 174%; a decrease in soluble starch in 80% and soluble proteins in 95.4%.

Histochemical study was agreement with biochemical results.

From our results we could suggest the use of *Lemna gibba* in the tertiary treatment of waste water to remove Pb, harvesting hydrophytes within 72 h to avoid toxicity effects of Pb in them and back the metal to water.

I. INTRODUCCION

Los elementos fundamentales (C, H, O, N, P, etc.) se renuevan constantemente en la biosfera mediante ciclos biogeoquímicos definidos, de tal suerte que existe un ciclo del agua, del carbono, del nitrógeno, etc., cuando estos ciclos se alteran, ocurre un desequilibrio ambiental.

Aunque la naturaleza tiene mecanismos de autopurificación, su capacidad autorreguladora no es infinita, y puede con frecuencia ser sobrepasada, produciéndose modificaciones irreversibles en el medio ambiente que al perturbar la vida son, por tanto, causa de enfermedad o muerte.

Las fuentes de contaminación ambiental tienen dos categorías : las antropogénicas, es decir las que se originan de las actividades humanas, y las de origen natural, como el vulcanismo y la erosión del suelo (Chediack, 1988). Actualmente entre los compuestos tóxicos ambientales de mayor importancia se encuentran los metales pesados, debido a que la rápida urbanización e industrialización provocan un aumento de sus concentraciones en el agua, suelo, aire y lodos.

Los metales pesados son elementos cuya gravedad específica es de $\geq 5 \text{ g/cm}^3$. Bajo esta denominación se incluyen los metales de transición; los grupos IIA, IIIB, IVB, VB, y VIB de la tabla periódica. Numerosos procesos industriales liberan en los sistemas naturales acuáticos metales pesados, como cadmio (Cd), cobre (Cu), plomo (Pb), mercurio (Hg), y

níquel (Ni). Su efecto en el ambiente depende de la especiación del metal en el agua, de la presencia de otros metales, así como de factores químicos y físicos que influyen en la fisiología de los organismos; en la estructura química del metal en el agua y en el metabolismo del organismo. Entre los tres iones metálicos más peligrosos para la salud humana están el Pb, el Hg y el Cd (Lester, 1987).

En México, la contaminación en cuerpos de agua es un problema importante, debido a la escasez del agua de consumo en las ciudades y al costo elevado de transportación para llevarla a los centros de población. Muchas sustancias tóxicas llegan a las aguas residuales municipales provenientes de las industrias, entre las que sobresalen los metales pesados, que además de difíciles de separar su tratamiento es costoso como sucede con el Pb, As, Se, Cd y Hg (Albert, 1988).

El metal pesado más frecuente en las aguas de la Ciudad de México es el Pb, puede llegar a los diferentes depósitos de agua por varias vías, una de ellas es la tierra con la cual el agua entra en contacto. Se estima que en los últimos 100,000 años el plomo ha llegado a los océanos a razón de 1.7×10^{10} g/año. De acuerdo con este dato el promedio mundial de plomo natural en los ríos es del orden de $0.5 \mu\text{g/L}$; sin embargo puede variar según la localidad, la geología de la cuenca y la actividad humana. Se calcula que el contenido actual de plomo en lagos y ríos, es de 0.5 a $1.0 \mu\text{g/L}$.

En las aguas superficiales, las mayores concentraciones se presentan generalmente cerca de las fuentes de contaminación; al respecto, las descargas industriales, la lluvia y las aguas residuales, son los contribuyentes más importantes de plomo en los ríos y lagos. Se estima que el transporte ocasionado por las tormentas en zonas urbanas e industriales asciende a $8 \times$

10⁹ g de plomo por año, equivalente a una adición de 4 µg/L a la descarga total de los ríos de los Estados Unidos.

Las aguas residuales municipales varían mucho en la concentración de plomo, dependiendo de la naturaleza del sistema colector y de la contribución de los desperdicios industriales al sistema. En ciudades con escasa industrialización, puede esperarse menos de 10 µg/L de Pb en las aguas residuales, no así en las zonas con gran desarrollo industrial, donde se han encontrado concentraciones de 100 a 500 µg/L (Pérez y Deleón, 1993).

En la Ciudad de México, el crecimiento demográfico e industrial origina problemas graves de contaminación ambiental. Actualmente cerca de 20 millones de personas habitan en la zona metropolitana y conurbada, las que producen el 36% del Producto Neto Bruto (PNB) nacional y es responsable de aproximadamente el 26% del consumo de energía en la República. En la ciudad capital se ha estimado que se emiten 4, 350 000 toneladas/año de contaminantes al aire; tres millones de vehículos y 30, 000 plantas industriales originan estos contaminantes.

El plomo es uno de los principales componentes; el 80% de los vehículos de la capital se fabricó antes de 1980, y otros antes de 1970, siendo responsables de los 14 millones de litros de gasolina con plomo consumido diariamente hasta 1988, fecha en la cual se retiró el tetraetilo de plomo y se empleó como aditivo antidetonante (Badillo, 1988). Otras fuentes de plomo atmosférico en la ciudad, son las fuentes fijas, tales como las fundidoras de plomo, las fábricas de baterías, pinturas, etc.

Para la remoción de metales pesados de cuerpos de agua y aguas residuales se aplican varios métodos fisicoquímicos (coagulación, floculación, ósmosis inversa, electroprecipitación,

flotación, intercambio iónico, etc.), y tratamientos biológicos con lodos activados que se han estudiado extensivamente a escala de laboratorio, piloto e industrial; sin embargo, no sedimentan ni eliminan los metales pesados. En los procesos biológicos se han usado tanto plantas acuáticas vasculares flotantes (*Pistia* spp. *Eichhornia crassipes*, *Lemna* spp., etc), como plantas acuáticas vasculares emergentes (*Typha*, *Scirpus*, etc.), para remover nutrientes y metales pesados.

De las plantas vasculares acuáticas, *Lemna* spp. (chichicastle o amoyo) ha sido objeto de experimentos a nivel industrial para remover nutrientes y metales pesados (Rodgers, et al., 1978; Culley, et al., 1981; Heysey, 1982; etc.). En esta investigación se planteó estudiar la eficiencia de *Lemna gibba* L., para remover el Pb del agua y los cambios bioquímicos (almidón soluble total, carbohidratos libres totales, fenoles totales, proteínas solubles totales y aminoácidos libres totales) e histoquímicos (almidón, proteínas y fenoles) que experimenta la planta durante la absorción del elemento. La presencia del Pb en el medio provoca estrés en la planta lo que ocasiona modificaciones en estos factores bioquímicos.

1.1. Justificación

A las aguas residuales municipales de la Ciudad de México llegan metales pesados que las contaminan, poniendo en peligro la salud; sobresale el plomo, que como se mencionó, fue usado como aditivo de la gasolina durante años, lo cuál determinó su presencia en los cuerpos de agua natural y en las residuales municipales. Se ha intentado remover del agua plomo y otros metales pesados por diversos métodos fisicoquímicos, como electroprecipitación; coagulación, intercambio iónico, flotación, etc. (Patterson, 1985), y aunque en ocasiones se logra un resultado eficiente, tienen un costo elevado de operación. Otros métodos alternos

son los biológicos, que resultan económicos en comparación con los fisicoquímicos, pues en los biológicos intervienen, todos activados microalgas y plantas vasculares acuáticas (Stover, et al., 1979). Las algas se han usado en el tratamiento terciario de aguas municipales habiéndose logrado remover metales pesados, sin dejar de señalar que es difícil separar la biomasa algal al final del tratamiento.

Las macrofitas acuáticas también se han utilizado para remover metales pesados de aguas residuales municipales y aunque al final del tratamiento haya generado una biomasa abundante, la misma puede ser separada con relativa facilidad. (Wolverton, et al., 1975, 1978; Muramoto y Oki, 1983). De las usadas en los tratamientos terciarios, destaca por su crecimiento rápido, productividad y facilidad de cosecha *Lemna spp.*, debido al tamaño de sus frondas, hasta 2.4 mm máximo (Jain, et al., 1988; Kwan y Smith, 1988, 1991; Oron y Willers, 1989; Skillicorn, et. al., 1993). *Lemna spp.*, es una planta acuática flotante común en cuerpos de agua dulce de zonas tropicales y subtropicales.

En este trabajo se aborda el estudio de los efectos que ocasiona la absorción del Pb por *Lemna gibba* L. algunos factores bioquímicos básicos como son almidón soluble total, azúcares libres totales, proteínas solubles totales, aminoácidos libres totales, y fenoles totales e histoquímicos, como almidón, proteínas y fenoles.

1.2. Objetivo general

Evaluar la capacidad de absorción máxima de plomo por *Lemna gibba* L. en medios enriquecidos, y la acción bioquímica del mismo con el fin de optimizar su uso en el tratamiento terciario de aguas residuales municipales.

1.2.1. Objetivos específicos

- a) Estudiar el efecto del plomo sobre la tasa de crecimiento de *Lemna gibba* L.
- b) Determinar el tiempo de máxima absorción de plomo por *Lemna gibba* L.
- c) Determinar la variación en los contenidos de clorofila **a**, clorofila **b** y clorofila total en *Lemna gibba* L. por efecto del Pb.
- d) Evaluar el efecto del período de iluminación, luz continua y luz discontinua (12 h luz-12 h oscuridad) en los tres parámetros mencionados.
- e) Estudiar los cambios bioquímicos en *Lemna gibba* L. provocados por el plomo mediante la cuantificación de los fenoles totales, el almidón soluble total, los azúcares libres totales, las proteínas solubles totales y los aminoácidos libres totales.
- f) Estudiar el efecto del plomo ocasiona a nivel histoquímico en *Lemna gibba* L. mediante técnicas de tinción de fenoles, almidón y proteínas.

1.3. Hipótesis de trabajo

- a) Si *Lemna gibba* L. es una hidrófita capaz de absorber plomo del agua bajo condiciones de luz y temperatura controladas; tanto la concentración máxima que es capaz de absorber, así como el tiempo en que se lleva a cabo la máxima absorción, pueden ser establecidos.
- b) El periodo de iluminación incide en la tasa de crecimiento relativo (**R**), así como en la capacidad de absorción del plomo y el contenido de fenoles totales, clorofila **a**, **b** y total de *Lemna gibba* L.

- c) La alteración metabólica de *Lemna gibba* L. ante la presencia de plomo en el medio, afectará la concentración de los fenoles totales; las proteínas solubles totales; los aminoácidos libres totales; el almidón soluble y los azúcares libres totales.
- d) Los cambios bioquímicos experimentados por *Lemna gibba* ante la presencia de plomo, se revelará también a nivel histoquímico.

II. ANTECEDENTES

II.1. Generalidades de metales pesados

Se consideran metales pesados a todos aquellos elementos con densidad atómica mayor de 6 g/cm³. Los estudios sobre metales pesados en ecosistemas han evidenciado que muchas áreas cercanas a complejos urbanos, minas metalíferas o carreteras contienen altas concentraciones de éstos elementos.

La actividad minera y la metalúrgica se practicaba principalmente en zonas que actualmente corresponden a Taxco, en el estado de Guerrero, la Cuenca del Río Balsas, la Sierra de Querétaro, Oaxaca y Chiapas, y desde la expansión regional virreinal, la minería ha sido una de las actividades de mayor tradición económica en México, estando presente en el desarrollo del país como un factor importante de modernización y avance, suministrando insumos a prácticamente todas las industrias, entre las que destacan las de la construcción, la metalúrgica, la siderúrgica, la química y la electrónica al sustentar parte de la fabricación de numerosos artículos de uso cotidiano, que van desde lápices, relojes, joyas, televisores, computadoras, automóviles y camiones, hasta la construcción de casas, edificios, carreteras así como la manufactura de una gran variedad de maquinaria y equipo.

- c) La alteración metabólica de *Lemna gibba* L. ante la presencia de plomo en el medio, afectará la concentración de los fenoles totales; las proteínas solubles totales; los aminoácidos libres totales; el almidón soluble y los azúcares libres totales.
- d) Los cambios bioquímicos experimentados por *Lemna gibba* ante la presencia de plomo, se revelará también a nivel histoquímico.

II. ANTECEDENTES

II.1. Generalidades de metales pesados

Se consideran metales pesados a todos aquellos elementos con densidad atómica mayor de 6 g/cm³. Los estudios sobre metales pesados en ecosistemas han evidenciado que muchas áreas cercanas a complejos urbanos, minas metalíferas o carreteras contienen altas concentraciones de éstos elementos.

La actividad minera y la metalúrgica se practicaba principalmente en zonas que actualmente corresponden a Taxco, en el estado de Guerrero, la Cuenca del Río Balsas, la Sierra de Querétaro, Oaxaca y Chiapas, y desde la expansión regional virreinal, la minería ha sido una de las actividades de mayor tradición económica en México, estando presente en el desarrollo del país como un factor importante de modernización y avance, suministrando insumos a prácticamente todas las industrias, entre las que destacan las de la construcción, la metalúrgica, la siderúrgica, la química y la electrónica al sustentar parte de la fabricación de numerosos artículos de uso cotidiano, que van desde lápices, relojes, joyas, televisores, computadoras, automóviles y camiones, hasta la construcción de casas, edificios, carreteras así como la manufactura de una gran variedad de maquinaria y equipo.

| <i>Producto</i> | <i>1986</i> | <i>1987</i> | <i>1988</i> | <i>1989</i> | <i>1990</i> | <i>1991</i> | <i>1992</i> | <i>1993</i> |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Antimonio | 3 337 | 2 839 | 2 185 | 1 906 | 2 614 | 2 743 | 1 064 | 1 775 |
| Arsénico | 5 315 | 5 304 | 5 164 | 5 551 | 4 809 | 4 922 | 4 293 | 4 501 |
| Bismuto | 749 | 1 012 | 958 | 883 | 733 | 651 | 807 | 1 042 |
| Cadmio | 174 558 | 230 573 | 268 359 | 249 328 | 298 695 | 284 174 | 279 042 | 293 401 |
| Cobre | 174 558 | 230 573 | 268 359 | 249 328 | 298 695 | 284 174 | 279 042 | 293 401 |
| Estaño | 585 | 369 | 274 | 159 | 7 | 15 | 5 | 3 |
| Molibdeno | 3 350 | 4 400 | 4 456 | 4 189 | 2 001 | 1 716 | 1 458 | 1 471 |
| Plomo | 182 672 | 177 161 | 171 337 | 163 017 | 177 279 | 160 046 | 172 563 | 196 337 |
| Selenio | 23 | 29 | 13 | 20 | 12 | 3 | N.S. | - |
| Tungsteno | 294 | 213 | 206 | 170 | 183 | 194 | 162 | - |
| Zinc | 271 351 | 271 480 | 362 228 | 284 058 | 322 487 | 300 706 | 289 119 | 328 223 |

Fuente: SEMIP. V Informe de Gobierno 1993, Presidencia de la República. México.1993. N.S. No significativo. Nota: Incluye las actividades de extracción, beneficio, fundición y afinación.

Tabla 2.1 Volumen de producción de metales industriales no ferrosos, 1986-1993 (toneladas).

Durante el siglo XVI, múltiples ciudades fueron fundadas cerca de las zonas mineras, tal es el caso de Durango, Chihuahua, Guanajuato, Saltillo, San Luis Potosí y Zacatecas, y por lo menos diez distritos mineros de México, en distintos períodos, ocuparon los primeros lugares de producción; dos de ellos han sobrepasado la producción de un billón de onzas troy de plata: Hidalgo del Parral en Chihuahua y Pachuca, en Hidalgo (Cañizares, 1996). En la tabla 1 se presenta el volumen de la producción minerometalúrgica en el período de 1986-1993. En el renglón de los metales industriales no ferrosos se ubican metales pesados, como Pb, Cu,

Zn, Sb, As, Bi, Sn, Cd, Se, W y Mo. En el caso del plomo, salvo pequeñas fluctuaciones, se ha mantenido constante, alcanzando su máximo valor en 1993.

Se está experimentando una "epidemia silenciosa" en el medio ambiente, debido a la velada presencia de metales venenosos provenientes de la minería, la manufactura y la disposición de metales y contenedores metálicos, los que inevitablemente causan contaminación ambiental (Alloway, 1990).

Se eligió el plomo para este estudio, debido a que es un contaminante muy común en el agua residual de la Ciudad de México, como resultado de su presencia en las gasolinas que hasta 1988 fueron utilizadas en los automotores, conteniendo como aditivo antidetonante tetraetilo de plomo. Por otra parte, la producción de acumuladores y baterías, pigmentos, insecticidas, explosivos, reactivos químicos, soldaduras, alfarería decorativa vidriada en hoja metálica y en barro, cubiertas para protección de rayos X, así mismo de tuberías, constituyeron y constituyen otras fuentes antropogénicas del plomo. En la tabla 2 se indica la producción de Pb mexicano en los últimos 17 años donde se indica que los valores no fluctúan de manera significativa de año en año México es el segundo productor en importancia de América Latina, siendo solo antecedido por Perú (Corey y Galvao, 1989).

Entre las fuentes naturales del plomo se encuentran la erosión del suelo, la lixiviación de los minerales de plomo y las emanaciones volcánicas. Su proporción en la corteza terrestre es aproximadamente de 15 ppm (mg/kg) y la cantidad total de plomo en ella se estima en 3.8×10^{14} ton (Badillo, 1988).

| <i>Año</i> | <i>ton.</i> | <i>año</i> | <i>ton.</i> | <i>año</i> | <i>ton.</i> | <i>año</i> | <i>ton.</i> |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| 1980 | 12 129 | 1985 | 17 228 | 1990 | 14 773 | 1995 | 14 981 |
| 1981 | 13 115 | 1986 | 15 223 | 1991 | 13 367 | 1996 * | 13 409 |
| 1982 | 12 154 | 1987 | 14 763 | 1992 | 14 380 | | |
| 1983 | 13 950 | 1988 | 14 278 | 1993 | 15 145 | | |
| 1984 | 15 276 | 1989 | 13 585 | 1994 | 13 653 | | |

Fuente: INEGI, 1996. *solo hasta junio

Tabla 2.2 Producción de Pb en Mexico en los últimos 17 años.

Se sabe que el plomo afecta adversamente a todos los seres vivos; inclusive en concentraciones de 0.1 a 0.5 mg/ml, este elemento retarda la ruptura heterolítica de la materia orgánica. Existen dos tipos de compuestos de plomo: los inorgánicos, que incluyen las sales y óxidos y, los orgánicos, principalmente el tetraetilo y el tetrametilo de plomo. Todos los compuestos inorgánicos actúan en el organismo de la misma forma una vez que han sido absorbidos, mientras que los compuestos orgánicos difieren de los primeros en cuanto a su proceso de absorción y de distribución en el organismo.

En el hombre, la intoxicación depende del tipo de compuesto de plomo absorbido; la crónica tiene lugar generalmente a través del tracto digestivo de óxidos, carbonatos y otros compuestos solubles en agua; en cuanto a la intoxicación aguda, es menos frecuente y suele resultar de la inhalación de partículas de óxido de plomo, el cual es altamente volátil y liposoluble. El síntoma mas común de la intoxicación aguda es el cólico gastrointestinal. Al principio existe un estado de anorexia, con síntomas de dispepsia y estreñimiento, después

suele ocurrir un ataque de dolor abdominal generalizado. Otros síntomas posibles son diarrea, sabor metálico en la boca, náuseas, vómito, lasitud, insomnio, y debilidad (Corey y Galvao, 1989).

II.2 Generalidades del Pb y fuentes de contaminación

El plomo es un elemento con número atómico 82, tiene valencias 4 y 2, una masa atómica de 207.19 y una densidad de 11.4. Su punto de fusión es 327 y su punto de ebullición 1620. Se conocía hacia 7 000 y 5 000 a.C. Los egipcios utilizaban el plomo para vidriar vasijas y los romanos para sus tuberías e innumerables objetos. El primer artefacto de plomo que se conoce fue encontrado en los Dardanelos en donde se asentaba una civilización llamada Abidos y data de antes de 3 800 A.C. (Badillo, 1988).

El plomo metálico es de color azul grisáceo y apariencia brillante; cristaliza en un sistema cúbico, con una distancia interatómica mínima de 3.492 Å. Entre sus propiedades físicas más importantes puede citarse su densidad alta y ser blando, flexible y maleable; tiene además un punto de fusión bajo y una baja elasticidad. Estas propiedades, así como su poca conductividad eléctrica, su gran resistencia a la corrosión y un alto coeficiente de expansión, determinan la utilización extensiva del plomo en la industria. Se usa también para la protección contra las radiaciones gama y los rayos X evitando que los protectores se vuelvan radioactivos.

El plomo se mezcla bien con metales no ferrosos, principalmente: estaño, antimonio, cobre y plata y es la base para un número importante de otras aleaciones de uso industrial; forma dos clases de sales, las plumbosas en las que actúa como divalente y las plúmbicas en las que es

tetravalente; las sales plúmbicas son difíciles de obtener y se descomponen rápidamente en el agua; es anfotérico y forma con otros cationes un gran número de plumbitos y plumbatos estables. En general no se disuelve en los ácidos diluidos, debido a que forma compuestos insolubles superficiales que inhiben la reacción posterior del metal. La insolubilidad del plomo metálico en ácido sulfúrico, debida a la formación de una capa insoluble de fosfato es importante en la fabricación de acumuladores, en la industria del ácido sulfúrico y en el manejo y almacenamiento de este último ácido.

El plomo es prácticamente insoluble en ácido fluorhídrico y se disuelve escasamente en soluciones de ácido clorhídrico; el nítrico lo disuelve completamente por su poder oxidante. La reacción del plomo ante los ácidos acético, cítrico, tartárico y otros de tipo orgánico se debe a la formación de complejos orgánicos muy estables.

El plomo se altera por agua en ausencia de aire. Al respecto la solubilidad en agua en ausencia de aire, a 24°C es cercana a 311 µg/L. En presencia de oxígeno atmosférico, el plomo se vuelve susceptible a todos los ácidos, incluyendo los muy débiles, como el ácido carbónico y aun el agua. En la naturaleza es ubicuo y es un constituyente de las rocas, del suelo, del agua, del aire, de las plantas y de los animales, aunque no se ha podido demostrar que sea un elemento esencial para los organismos vivos.

La cantidad total estimada de plomo en la corteza terrestre alcanza los 3.8×10^{20} g, y en el suelo los 4.8×10^{15} g. Sin embargo, las fuentes principales de contaminación por plomo, son los depósitos explotables que se calcula están entre 2 y 4×10^{15} g. Desde el siglo pasado se han fundido 1.3×10^{14} g de minerales de plomo, y se han quemado 1.0×10^{13} g de alquiles de plomo. Actualmente, la cantidad de plomo beneficiada cada año en el mundo y dispersada

por las actividad industrial es 50 veces mayor que la cantidad total almacenada en la biota marina viviente (8×10^8 g). La amplia difusión del plomo ha dado como resultado su presencia en varios sistemas que sostienen la vida del hombre.

Hoy en día hay una preocupación general sobre su efecto en la salud por exposición prolongada al ambiente. La posibilidad real de que la contaminación por plomo se torne en una amenaza crónica para la salud, ha generado la necesidad de conocer mucho más acerca de las fuentes tanto como naturales y artificiales del plomo, de su movimiento y transformación en varios ecosistemas, y de su ciclo en la biósfera (Pérez y Deleón, 1993).

El plomo en su forma natural como otros metales, tiene poca importancia como fuente de contaminación ambiental. Sin embargo, con el crecimiento de la actividad industrial las fuentes de contaminación por éste y otros metales han aumentado de modo notable. Lo más frecuente es que la contaminación del medio por plomo ocurra, dada la actividad minera e industrial y en particular de vehículos automotores. Como agente contaminante del ambiente comprende casi en su totalidad formas inorgánicas, pero pueden generarse cantidades de plomo orgánico derivado de la combustión de la gasolina, así como de la alquilación natural del elemento para dar lugar a compuestos de metilo de plomo (Corey y Galvao, 1989).

II.2.1. En el ambiente ocupacional

(a) Minería y Fundición

La actividad minera del plomo constituye la fuente de exposición más directa; no obstante, se halla por lo general en forma de sulfuros, los cuales son insolubles, por tanto sólo tienen importancia relativa a causa de la posibilidad de ser ingeridos. Una vez en el tracto digestivo, los mismos son absorbidos de manera moderada.

(b) Industria

El plomo está presente en diversos procesos industriales, ya sea como componente de la materia prima, la producción de baterías, pigmentos y cables, o como parte de los subproductos del proceso, como en el caso de la imprenta o por el uso de soldadura. Su utilización como materia prima, suele generar una concentración del elemento muy elevada, hasta de $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Las industrias que presentan mayor riesgo por la presencia de plomo, son las de las siguientes áreas:

- Alfarería
- Antidetonantes para gasolina
- Baterías
- Coberturas de cable
- Construcción de cañerías

- Imprenta
- Municiones
- Pigmentos para pintura
- Productos de acero
- Elementos para protección contra radiaciones
- Tubería de plomo

II.2.2. En el ambiente en general

Las rutas y tasa de ingreso al medio, y la bioacumulación que experimenta el elemento aún necesita investigación; el mecanismo primario por medio del cual se produce la extensa y variada contaminación por plomo en el ambiente, lo constituye la emisión del metal o sus compuestos hacia el aire, ruta a través de la cual alcanza una alta capacidad contaminante en casi todos los ecosistemas. En el ambiente urbano, las principales fuentes de contaminación son, la combustión de gasolina con aditivos de plomo- que en general constituye el primer lugar en orden de importancia con un aporte porcentual muy alto- y, en segundo lugar, la fundición de plomo. En el diagrama de flujo se presentan las vías potenciales de distribución y transporte del plomo atmosférico hacia el organismo, así como su incorporación a otros componentes tales como el aire, el agua, el suelo y los alimentos.

a) Aire

La presencia del plomo en el aire adquiere interés por la facilidad con que éste puede penetrar por las vías respiratorias y ser absorbido por el organismo; la mayor parte del plomo en el aire se presenta bajo la forma de partículas finas. No se sabe mucho sobre los compuestos químicos más importantes del plomo cuando está en el aire. En la atmósfera se ha observado la presencia de haluros, óxidos, sulfatos y carbonatos de plomo.

El plomo de la corteza terrestre no contamina de manera significativa el aire, como ocurre con otros metales. Las emisiones de plomo hacia la atmósfera (fundiciones, industrias y vehículos motorizados) constituyen la causa más importante de contaminación, y son en general por lo menos, unas 20 veces mayores que las emisiones naturales. Alrededor del 50% o más del plomo emitido al aire por fuentes antropogénicas corresponde al que proviene de automotores. Las concentraciones de plomo en el aire varían de acuerdo con la distancia a la fuente contaminante, encontrándose concentraciones de hasta $6.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en áreas sometidas a tránsito elevado en algunas ciudades europeas. Para un habitante urbano, el aire aporta en promedio de 6 a 9 μg de plomo diario a su organismo.

| <i>Parámetros</i> | <i>Límites máximos permisibles:</i> | |
|--|-------------------------------------|--------------------|
| | <i>Promedio diario</i> | <i>Instantáneo</i> |
| Temperatura °C | - | 40°C |
| PH | 6.9 | 6.9 |
| Sólidos sedimentables (ml/L) | 5 | 10 |
| Grasas y aceites (mg/L) | 60 | 100 |
| Conductividad eléctrica (microhoms/cm) | 5 000 | 8 000 |
| Aluminio (mg/L) | 10 | 20 |
| Arsénico (mg/L) | 0.5 | 1.0 |
| Cadmio (mg/L) | 0.5 | 1.0 |
| Cianuro (mg/L) | 1.0 | 2.0 |
| Cobre (mg/L) | 5 | 10 |
| Cromo hexavalente (mg/L) | 0.5 | 1.0 |
| Cromo total (mg/L) | 2.5 | 5.0 |
| Fluoruros (mg/L) | 3 | 6 |
| Mercurio (mg/L) | 0.01 | 0.02 |
| Níquel (mg/L) | 4 | 8 |
| Plata (mg/L) | 1.0 | 2.0 |
| Plomo (mg/L) | 1.0 | 2.0 |
| Zinc (mg/L) | 6 | 12 |
| Fenoles (mg/L) | 5 | 10 |
| Sustancias activas al azul de metileno (mg/L) | 30 | 60 |

Tabla 2.3. NOM-CCA-031-ECOL/1993. De la descarga de aguas residuales provenientes de la industria, actividades agroindustriales, de servicios y el tratamiento de aguas residuales a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano municipal.

b) Agua.

El agua en áreas no contaminadas posee bajas concentraciones de plomo; 1 $\mu\text{g/L}$ en aguas superficiales y alrededor de 8 $\mu\text{g/L}$ en los ríos. Las concentraciones de plomo en el agua de mar son más bajas aun que en ríos y lagos. En aguas oceánicas superficiales las concentraciones oscilan entre 0.05 a 0.4 $\mu\text{g/L}$, y en las subterráneas se han observado concentraciones de alrededor de 0.03 $\mu\text{g/L}$, hasta en 1 000 m de profundidad.

En las regiones donde hay contaminación por metales pesados, su concentración es muy variable e incluso se puede elevar notablemente, reportándose niveles de hasta 100 $\mu\text{g/L}$. La concentración de plomo en agua potable también varía mucho, registrándose niveles comprendidos entre 3.7 y 139 $\mu\text{g/L}$, y sobrepasando, en ocasiones, el límite de 50 $\mu\text{g/L}$ establecido por la OMS. En algunos países se han descrito cuadros de saturnismo atribuidos a concentraciones de plomo en agua potable de hasta 2.6 mg/L.

La exposición al plomo presente en el agua es, sin embargo, mínima debido a que éste forma carbonatos y sulfatos. Además, el agua potable tiende, en líneas generales, a tener menor contenido de plomo que el agua de fuentes no tratadas, debido a que es en parte removido por las plantas convencionales de tratamiento de agua potable. Cuando se detectan niveles elevados de plomo en la red y en los estanques de almacenamiento, especialmente en el caso de las aguas blandas o de pH bajo, los mismos son resultado por lo general de la corrosión sobre estas estructuras. El consumo de agua por el hombre, asumiéndose una ingestión de 2 l/día, puede significar un aporte sistemático comprendido entre 10 μg a 1 mg o más al día. Dado estos antecedentes, la importancia de la concentración de plomo en el agua debe ser considerada según el uso que el hombre le dé a la misma.

En la Tabla 2.3 se presenta la norma mexicana vigente para la descarga de aguas residuales que contienen plomo, entre otros metales pesados.

c) Suelo

La concentración media de plomo en el suelo es semejante a la concentración natural en la corteza o en las rocas (5 a 25 mg/kg) en zonas no expuestas a la actividad humana. En áreas contaminadas, es posible encontrar en el suelo concentraciones de hasta 8 g/kg.

El suelo se contamina principalmente por depósito de partículas del aire y por agua contaminada. La lixiviación de las pinturas aplicadas en los exteriores e interiores de las casas ha sido en algunos casos una fuente importante de intoxicación, principalmente para niños pequeños que pueden ingerir tierra. El uso de plaguicidas con plomo (arseniato de plomo, por ejemplo), también constituye un elemento adicional de contaminación de los suelos, especialmente agrícolas.

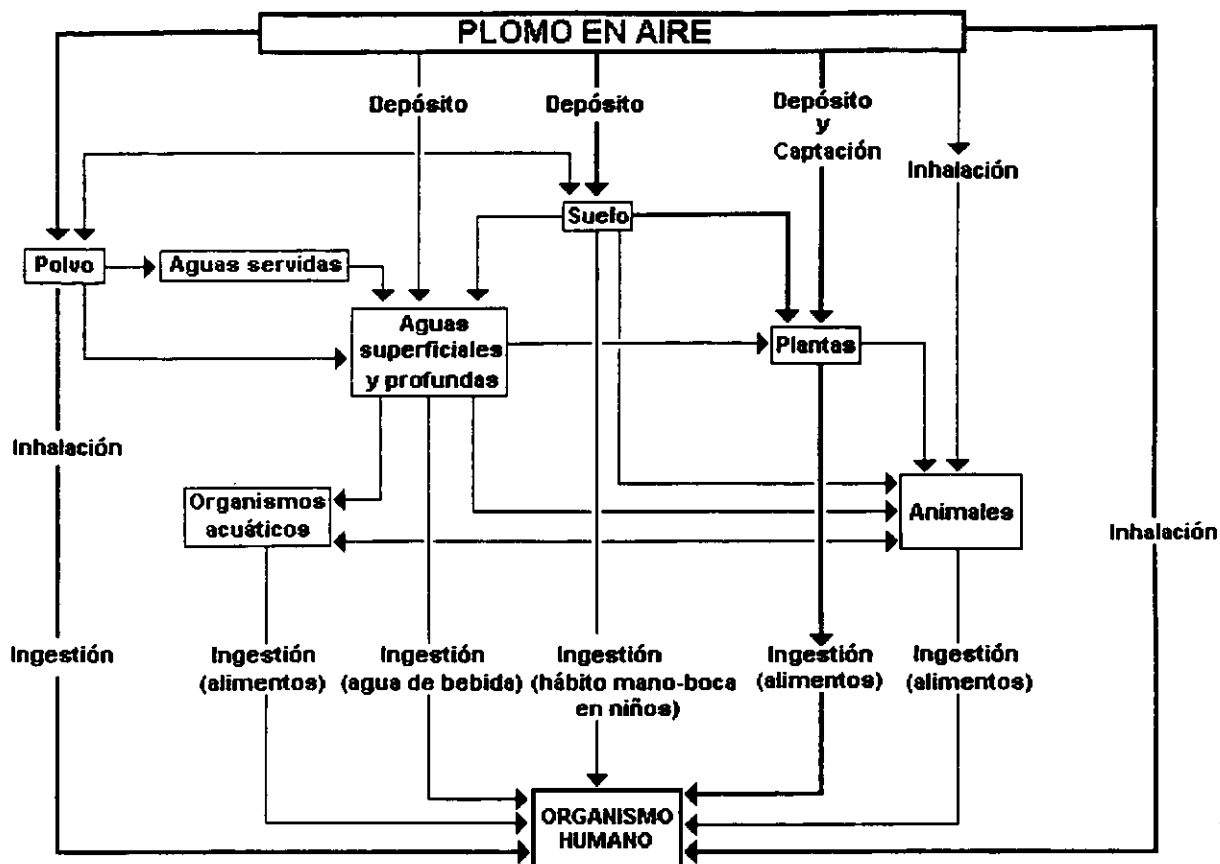
d) Alimentos

La cantidad de plomo ingerida a través de los alimentos varía mucho, según el tipo de producto. Los análisis efectuados en diversos países han demostrado que el aporte de plomo puede ser de 1.5 mg/kg en condimentos, de 0.2 a 2.5 mg/kg en pescados y mariscos, y de hasta 1.3 mg/kg en cereales y legumbres. En algunas zonas la ingestión ha sido diaria, de hasta 2.6 mg en campesinos que residían cerca de una fundición. Los valores medios de ingestión total de plomo al día en la ración de alimentos varían según el país y el autor, oscilando entre 17.8 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 518 $\mu\text{g}/\text{día}$. Un promedio general estimado es del orden de 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ para los adultos.

Las frutas, verduras y cereales se contaminan con plomo, ya sea por absorción directa a partir del suelo o bien por la deposición de partículas en sus superficies a partir del aire contaminado. Los utensilios metálicos de cocina con soldaduras de plomo, sean de peltre o de cobre con recubrimiento de estaño constituyen agentes muy importantes en contaminación de alimentos, se han observado concentraciones de alrededor de $0.03 \mu\text{g/L}$. e igualmente los utensilios domésticos de alfarería vidriada usados para cocinar o almacenar alimentos, agua y bebidas, especialmente si éstos son ácidos. Las latas de conservas con soldaduras de plomo representan un riesgo relativo, ya que se ha comprobado que liberan plomo hacia el alimento, en dependencia del pH de éste, así como de la tecnología empleada para producir la conserva. Aunque el plomo se acumula en muchos organismos propios de muy variados ambientes, especialmente en los acuáticos, hay pocos estudios que demuestren su acumulación creciente en la cadena trófica.

e) Tabaco.

Cada cigarrillo puede contener de 2 hasta $12 \mu\text{g}$ de plomo. Gran parte del mismo se elimina con la combustión, pero aún así se inhala un 2%, lo cual equivale fumando 20 cigarrillos por día, a una absorción diaria de 1 a $5 \mu\text{g}$ de plomo por el organismo,



Fuente: Adaptado de Publicación Científica N° 388 de OPS. Criterios de Salud Ambiental 3, Plomo. 1979.

Figura 2.1 Diagrama de flujo : importancia del plomo atmosférico en la contaminación global del ambiente y en el aporte de plomo al organismo humano.

f) Otras fuentes.

Por la gran variedad de usos que se hace del plomo, suelen existir en el ambiente otras variadas formas de exposición. Una fuente importante, principalmente para los niños, pueden ser las pinturas de las paredes de las casas, que por desgaste producen polvo con altas concentraciones de plomo. Se han identificado concentraciones de plomo en suelo cercano a las casas, de 900 a 2 300 mg/kg, según la distancia (Finkelman, 1994)

Existen otras fuentes importantes que aunque han causado eventualmente intoxicación, no afectan sectores grandes de población, estos son la destilación ilegal de whisky, los recipientes de cerámica inadecuadamente barnizados, el uso de baterías desechadas como combustible, algunos cosméticos, las de grabados en color y las ropas de personas que trabajan con plomo (Figura 1).

II.3 Absorción de metales pesados por las plantas y su toxicidad

Los cambios ambientales tienen repercusión directa sobre las plantas. Cualquier variación física o química del medio circundante que provoque una acción negativa sobre la planta se convierte en un factor o situación de estrés, cuyas situaciones de estrés son de tres tipos: físicas, químicas y biológicas; como ejemplo de estrés físico se puede citar la carencia o exceso de luz y la acción de bajas o altas temperaturas; el estrés químico suele ser producido por ciertos iones, así como por los cambios osmóticos o salinos; finalmente el estrés biológico es provocado por infecciones con hongos, bacterias o virus, así como por relaciones interespecíficas de parasitismo o depredación.

La nutrición es, al igual que en los animales, un proceso fundamental en las plantas. Se admiten tres tipos diferentes de nutrientes: *esenciales*, *beneficiosos* y *tóxicos*; un elemento se considera *esencial*, cuando la planta lo requiere en alguno de sus procesos metabólicos, sin que otro elemento lo sustituya en su función. Actualmente se ha podido demostrar el carácter esencial de 16 elementos: C, H, O, N, S, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, B y Cl. Los elementos *beneficiosos* estimulan el crecimiento de las plantas; para ciertas especies vegetales y bajo determinadas circunstancias, se encuentran el Ni, Cr, Na, Si, V y Co. Cualquier elemento integrante de alguna de esas dos modalidades, a partir de cierta

concentración crítica manifiestan esta peculiaridad. Otros, aun en cantidades mínimas, se convierten en elementos *tóxicos*; en este último caso se encuentra el Cd, el Pb y el Hg, entre otros. Cada elemento tóxico opera en forma distinta y peculiar. Los metales pesados no constituyen un grupo homogéneo, mientras que en concentraciones mínimas el Fe, el Mn, el Zn y el Mo resultan necesarios para las plantas, el Cd, el Hg, el Pb y el U son permanentemente tóxicos (Fitter y Hay, 1987).

La respuesta de una planta ante el estrés por metales pesados dependerá de: 1) el grado de sensibilidad o de resistencia al efecto tóxico del metal, íntimamente relacionado con el mecanismo genético evolutivo de adaptación selectiva; 2) el nivel de acción del metal en cuestión sobre la planta; por lo general, resulta difícil distinguir entre los mecanismos primarios de acción (sobre membranas, pared celular, a nivel genético, etc.) aquellos mecanismos secundarios que se disparan y que afectan numerosas funciones de las plantas, determinando un sistema muy complejo de interacciones y de posibles ajustes internos; 3) la capacidad del metal para formar complejos estables con una amplia gama de ligandos orgánicos, lo cual incide en determinados procesos catalíticos, en su movilidad y una vez en el interior de la planta y su probabilidad de secuestro en algún compartimiento celular; 4) la participación activa del metabolismo celular en el sistema de transducción de las señales procedentes del medio exterior a la situación que se crea en el interior de la planta, con los consiguientes cambios fisiológicos que afectan diversos procesos pautas de crecimiento, distribución y balance de nutrientes, economía hídrica, respuestas hormonales y ajustes metabólicos y osmóticos (Barceló, 1989).

| Elemento | Especies |
|-----------------|--------------------------------|
| plomo | <i>Bryum pseudotriquetrum</i> |
| | <i>Dicranella vara</i> |
| | <i>Philonotis fontana</i> |
| | <i>Fontinalis aquamosum</i> |
| | <i>Scapania undulata</i> |
| cobre | <i>Calypogeia muelleriana</i> |
| | <i>Merceya ligulata</i> |
| | <i>Mielichhoferia elongata</i> |
| | <i>Mielichhoferia nitida</i> |
| | <i>Nardia scalaris</i> |
| | <i>Pleuroclada albescens</i> |
| níquel | <i>Oligotrichum hercynicum</i> |
| zinc | <i>Cephalozia bicuspidata</i> |
| | <i>Pholia nutans</i> |

Fuente Larcher, 1995.

Tabla 2.4 Musgos tolerantes a metales pesados

Por lo general, los metales pesados se acumulan en la planta en concentraciones superiores a las del medio; la raíz es el órgano de máxima acumulación, porque en la mayor parte de los casos la contaminación por metales pesados provoca la acumulación de los mismos en el suelo, esta intoxicación afecta sucesivamente el tallo y sobre todo a las hojas, en donde se produce una disfunción en el sistema de compartimentación subcelular. Los organelos más

dañados son los cloroplastos y las mitocondrias, lo cual conlleva tanto una alteración de los pigmentos fotosintéticos, como la consiguiente disminución de la biosíntesis de las clorofilas, además de la afectación del sistema de membranas y tilacoides.

En la fase más avanzada de alteración de la raíz y las hojas, se producen cambios metabólicos intensos y de regulación, observándose finalmente una estimulación de la senescencia por acumulación crónica del metal pesado, lo cual puede resultar en la muerte de la planta. La respuesta de la planta ante la presencia de un metal pesado, se centra en primer lugar en las propiedades de elasticidad de la pared celular, debido a que ésta constituye la base de los mecanismos de crecimiento por extensión o elongación de la célula vegetal, así como el factor principal de la regulación de las propiedades osmóticas y el potencial de turgencia de la misma. Este hecho y la regulación diferencial del grado de abertura de los estomas, explica el comportamiento distinto de una misma planta, según se halle sometida a estrés por uno u otro metal.

Las poliaminas y el ácido abscísico son sustancias reguladoras en situaciones de estrés vegetal. Las poliaminas, ligadas a distintas fracciones del metabolismo celular (ácidos nucleicos o sustancias fenólicas), muestran una función protectora. El ácido abscísico actúa en la regulación adaptativa de las funciones hídricas y fotosintéticas de la hoja por su ajuste hidroactivo sobre el cierre de estomas en respuesta al estrés iónico provocado. Pueden vislumbrarse también notables afectaciones de la estructura y ultraestructura de la planta; las alteraciones se manifiestan por lesiones en la superficie de las raíces, precipitados en las vacuolas, y en el citoplasma de las raíces y tallos, daños de las membranas, especialmente en los tonoplastos de raíces y tallos, y alteración de la ultraestructura de los cloroplastos en las hojas trifolioladas (Barceló, et al., 1989).

Las plantas son organismos sedentarios que están constantemente expuestos a emisiones locales de metales pesados y por esta razón pueden usarse como bioindicadores de una gama de elementos. Los bioindicadores en este caso pueden ser plantas o comunidades vegetales sensibles al estrés por contaminación, y responden con alteraciones de sus procesos vitales (indicadores por respuestas) o mediante la acumulación del contaminante (indicadores por acumulación). Ambos tipos de respuesta son útiles para evaluar la intensidad del impacto ambiental. En la tabla 4 se exponen los musgos tolerantes a metales pesados, los mismos constituyen buenos ejemplos de indicadores de bioacumulación.

Las plantas indicadoras por respuesta expresan los cambios del medio en dependencia de sus requerimientos específicos por declinación, desaparición, o contrariamente por su abundancia, o alta tasa de crecimiento y reproducción. Los cambios en la composición florística, y la declinación de ciertas especies son buenos indicios de estrés a largo plazo.

Las plantas indicadoras se caracterizan por tener un alto grado de sensibilidad a ciertos contaminantes; bajo condiciones preestablecidas y sobre la base de criterios bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, estas plantas pueden indicar la presencia de sustancias fitotóxicas y en ciertos casos de sus cantidades, por ejemplo, las macro fitas sumergidas, *Potamogeton crispus*, *Elodea canadensis* y *Potamogeton lucens* que se consideran indicadoras de plomo (Larcher, 1995).

Las plantas y animales pueden usarse para el monitoreo de la calidad ambiental, a través de la detección cualitativa y cuantitativa de respuestas específicas a contaminantes que les causan estrés; el monitoreo puede basarse en observaciones o análisis de la planta en su ambiente natural (monitoreo pasivo), o bien en material vegetal estandarte expuesto en un

área de estudio (monitoreo activo). Un numeroso grupo de especies indicadoras muy sensibles se encuentran entre las criptógamas y fanerógamas.

Las plantas indicadoras de bioacumulación portan grandes cantidades de contaminantes y son susceptibles de ser usadas en ambos monitoreos, pasivo y activo; tales vegetales, usualmente acumulan un elemento en particular, y el análisis químico de ellos permiten evaluar el grado de contaminación de una localidad.

Los musgos, con su especial capacidad de absorción, incorporan grandes cantidades de iones (tabla 3.4); el líquen *Hypogymnia physodes* evidencia los daños que causan contaminantes gaseosos, como el SO_2 , sobre la base de la destrucción de su clorofila, y además acumula contaminantes minerales (Pb, Zn, Fe, Mn) en áreas urbanas.

Hay ciertas especies de plantas que son distintivamente indicadoras de la presencia de metales pesados y se consideran metalofitas (tabla 2.5).

| Especies | Elemento | Concentración (mg/kg) |
|------------------------------|----------|-----------------------|
| <i>Eichhornia crassipes</i> | Fe | 14 400 |
| <i>Mimuartia verna</i> | Cu | 1 030 |
| <i>Thlaspi coerulescens</i> | Zn | 25 000 |
| <i>Mimuartia verna</i> | Pb | 11 400 |
| <i>Jasione montana</i> | As | 31 000 |
| <i>Mechovia grandiflora</i> | Mn | 7 000 |
| <i>Acrocephalus robertii</i> | Co | 1 490 |
| <i>Psychotria douarreri</i> | Ni | 45 000 |
| <i>Pearsonia metallifera</i> | Ci | 490 |
| <i>Astragalus preussi</i> | U | 70 |
| <i>Astragalus racemosus</i> | Se | 15 000 |

Fuente : Larcher, 1995.

Tabla 2.5. Plantas metalofitas y sus contenidos de elementos minerales.

Las metalofitas obtienen una gran cantidad de metales pesados y los almacenan en su interior en concentraciones superiores a 0.5 ó 0.8 g/kg en peso seco (en casos extremos por arriba de 25 g/kg). Estas concentraciones son de 100 a 1000 veces mayores a la concentración usual de los elementos traza en una planta; dichas cantidades se aproximan a la magnitud de los macronutrientes, como fósforo y azufre. La gran capacidad de la planta flotante *Eichhornia crassipes* (lirio acuático o huachinango) para acumular iones metálicos es empleada en la detoxificación de lagos y ríos. Los estudios sobre la absorción del Pb por las plantas se han realizado básicamente en plantas terrestres

Se conoce que las plantas absorben del suelo una proporción mínima de Pb; el 90-99% del Pb presente en los tejidos vegetales proviene de la absorción foliar. Son significativas las emisiones de Pb procedentes de la combustión de la gasolina y su influencia negativa sobre la vegetación cercana a las autopistas; se trata en este caso de contaminación aérea directa a causa de partículas en suspensión atmosférica, que llegan también al suelo por deposición seca o por arrastre de lluvia o nieve. El Pb depositado en el suelo, en su forma soluble, es captado por las raíces, donde se almacena, dada su escasa movilidad, mientras que la contaminación atmosférica daña directamente la parte aérea de la planta, especialmente las hojas; de esta forma, por doble vía, raíz y hoja, las plantas pueden alcanzar niveles tóxicos de Pb (Cook, 1994).

La absorción del Pb y su transportación a través del tallo de gramíneas se ha estudiado con cultivos en soluciones convencionales. Se encontró que el Pb translocado en el tallo fue de 3.5 a 22.7% del total absorbido después de siete días. Otras investigaciones con técnicas histoquímicas para investigar la distribución del Pb en plántulas de rábano, demostraron que el metal se acumula en la endodermis, la cual actúa como una barrera parcial para la

translocación del Pb en el tallo. Por otra parte, se ha llegado a la conclusión de que la absorción y translocación de Pb en plantas es altamente dependiente de su estado fisiológico.

Bajo condiciones de crecimiento óptimo, el Pb se precipita sobre las paredes celulares en una forma amorfa insoluble, identificándose en plantas de maíz como fosfato de plomo; también se ha llegado a que la absorción por las raíces y la translocación a los tallos varía estacionalmente, incrementándose durante el otoño y el invierno. El Pb absorbido y su disponibilidad en el sustrato ha sido motivo de discusión en relación a si esta dependencia es de carácter lineal, llegándose a establecer que en la mayoría de las especies la misma constituye una relación directamente proporcional, y la absorción comienza progresivamente a disminuir a concentraciones muy elevadas. Como puede apreciarse, aunque el Pb esté disponible para las plantas terrestres, su comportamiento atendiendo la solubilidad y movilidad determinan que su biodisponibilidad sea baja (Alloway, 1990).

II.3.1 Mecanismos de resistencia a la toxicidad por metales pesados en las plantas

La absorción de iones metálicos por las células vegetales, especialmente radicales, se facilita por diversos mecanismos establecidos para el transporte y acumulación de los mismos, dado que algunos metales pesados se requieren por las plantas como microelementos esenciales, tal es el caso del Zn y el Cu. La planta no puede, sin embargo, prevenir la incorporación de elementos tóxicos debido al mismo mecanismo por el que entran los microelementos antes señalados. La toxicidad de los iones metálicos se debe principalmente a su interferencia con el transporte de electrones en la respiración y en la fotosíntesis, así como a la inactivación de enzimas vitales, lo cual da como resultado una

baja en el estado energético y una disminución de la absorción de nutrientes con la consiguiente reducción del crecimiento.

La mayoría de las plantas son sensibles a los metales pesados en mínimas concentraciones. Sin embargo, ciertas plantas pueden crecer en hábitats contaminados, debido a que desarrollan una variedad de mecanismos de protección, por medio de los cuales el exceso de metales pesados puede ser eliminado sin daños aparentes. No parece haber un mecanismo único de comportamiento de las plantas frente a los metales pesados, debido a la falta de uniformidad en sus propiedades físico-químicas. Se conocen distintas estrategias de las que se vale la planta para su defensa o adaptación, entre las que están:

- i) Escape Fenológico: cuando el estrés es estacional la parte activa del ciclo de vida puede coincidir con la estación más favorable.
- ii) Exclusión: la planta puede ser capaz de reconocer al ión y prevenir su absorción, evitando así el efecto tóxico que pudiera provocar.
- iii) Amelioración: la planta puede absorber el ion pero actúa sobre él por varias vías de tal manera que disminuye su efecto. Entre estas están la quelación, la dilución, la localización, o la excreción.
- iv) Tolerancia: la planta puede haber desarrollado rutas metabólicas que funcionan ante concentraciones metálicas potencialmente tóxicas, posiblemente por medio de enzimas específicas.

Las especies más resistentes a los iones tóxicos normalmente emplean más de un mecanismo adaptativo, aunque la adopción de alguno de ellos o su combinación, implica limitaciones fisiológicas y ecológicas (Fitter y Hay, 1987).

En los mecanismos por exclusión del metal tóxico, la planta logra evitar su toxicidad dificultando la absorción del elemento, mediante el incremento de la resistencia de la membrana. Esta se opone a la captación y transporte del metal, como se ha descrito para el Cu y el Zn en algunas especies vegetales estudiadas. En otros casos el Zn provoca inhibición del mecanismo de absorción activa, impidiendo así su captura y acumulación interna. La regulación de los espacios de compartimentación subcelular y las respuestas moleculares que tienden a contrarrestar al elemento tóxico en el interior de la célula constituyen otros mecanismos de resistencia de la planta.

En el funcionamiento celular de una planta están presentes finos mecanismos de homeostasis, o equilibrio funcional los cuales tienden a mantener un balance de los nutrientes, de los metabolitos celulares así como de otras sustancias. La pared celular, hacia el exterior de la célula, y, en el propio interior, la gran vacuola central, que forma casi el 80% del volumen de una célula vegetal adulta diferenciada, son zonas importantes de regulación del contenido "interior", metabólicamente muy activo, que representa al citosol y a diversos orgánulos como los cloroplastos y mitocondrias. (Larcher, 1995).

Últimamente ha suscitado mucho interés la posible existencia de metalotioneínas vegetales (conocidas ya en los mecanismos de detoxificación de los metales pesados en los animales). Se les propuso el nombre de fitoquelatinas (Grill, 1985), para referirse a aquellas proteínas similares a las metalotioneínas, compuestas de unidades repetitivas de γ -glutamilcisteinil y

glicina terminal; aunque en ciertos casos, como ocurre en *Agrostis gigantea*, hay ligeras variaciones en la composición del péptido debido a la aparición del aminoácido serina. Estas fitoquelatinas son desde un punto de vista estructural completamente diferentes a las metalotioneínas reportadas previamente en vertebrados y hongos. Las metalotioneínas de mamíferos han sido descritas como simples cadenas de polipéptidos con 61 aminoácidos residuales y un tamaño de 6.5 KD. Las fitoquelatinas alcanzan por el contrario 10 KD. No obstante estas diferencias entre las metalotioneínas y las fitoquelatinas, ambas sirven al mismo propósito de atrapar el exceso de metales pesados por medio de complejos mercaptidos (Taiz y Zeiger, 1991).

En la naturaleza, las concentraciones relativas y absolutas de los metales pesados son muy variables, de ahí que sus interacciones y su efecto sobre los diferentes organismos sea también diversa. Numerosas investigaciones han establecido que la toxicidad de los metales pesados sobre los organismos acuáticos está más relacionada con la actividad del ion metálico libre, que con la concentración total del mismo y que ésta actividad puede reducirse por agentes complejantes o quelantes, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y varias de sus sales, las que se enlazan a los metales. Otros quelantes efectivos son el ácido 2,3-dimercapto succínico (DMSA) y el 2,3-dimercapto-1-propano sulfonato (DMPS) (Cañizares, 1996).

Aunque no existe un sistema único de detoxificación, Sin embargo, en suelos contaminados con varios metales pesados se ha comprobado que las plantas presentan una tolerancia múltiple. Solo en un caso se ha observado cotolerancia (tolerancia a un metal no presente producida por otro presente). La existencia de un estrés hace a la planta más susceptible a otras tensiones (hídrica, nutritiva, térmica y biótica). En estas interacciones, apenas

conocidas, se describen fenómenos de sinergismo (combinaciones que incrementan los efectos fisiológicos, normalmente negativos, en este caso) y de antagonismo (que contrarrestan y disminuyen el efecto negativo). En general, los costos energéticos para la adaptación de la planta al estrés son muy altos.

Las plantas resistentes son menos capaces de competir y sobrevivir en ambientes normales, en los que no se presenta la presión de estrés. Hay plantas que actúan como hiperacumuladores del metal pesado. Ocurre esto, por ejemplo con el Ni en suelos serpentinos. Existen especies bioindicadoras que retienen selectivamente un metal pesado y permiten así reconocer la presencia del mismo en el suelo. Entre estas últimas se encuentran *Polycarpha spirostyles* y *Becium homblei* para el Cu, *Viola calaminaria* para el Zn, *Eriogonum ovalifolium* para el Ag, y diversas especies de *Alyssum* para el Ni. Por su peculiar biología los musgos y líquenes actúan como verdaderos sumideros de la contaminación por metales pesados. Este hecho está provocando un fuerte cambio en la distribución y composición de esta flora en las zonas industriales y contaminadas, afectando incluso el color de la fachada de las catedrales (Barceló, 1989).

II.4 Contaminación por plomo en los ambientes naturales acuáticos y sus efectos en la biota acuática

El plomo puede entrar a un sistema acuático, por medio del escurrimiento o por las corrientes fluviales en forma iónica (Pb^{2+}), como complejos inorgánicos u orgánicos o unido a los sólidos suspendidos o a los sedimentos de los lechos. Dependiendo de la práctica agrícola local, también pueden llegar a través del escurrimiento, fungicidas con

plomo o sus derivados. Sin embargo, el aporte es bajo en general; se considera menor del 30% del total anual incorporado al medio natural. En la actualidad se acepta que las mayores fuentes de plomo en los sistemas acuáticos naturales las constituyen la precipitación atmosférica, a través del acarreo de partículas depositadas y junto con otros metales pesados, las descargas, domésticas e industriales de aguas negras y de desechos (Tabla 4) Una buena parte de estos últimos puede estar unidos a compuestos orgánicos.

| | Al | Sb | As | Cd | Cr | Co | Cu | Fe | Pb | Mn | Hg | Mo | Ni | Se |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Plantas de energía | | | | | X | | | | | | | | | |
| Fundidoras de acero Básico | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Deposición | X | | | X | X | | X | | X | X | X | | X | |
| Cemento y vidrio | | | X | X | | | | | | | | | | X |
| Sustancias químicas Orgánicas, petroquímicas | X | | X | X | X | | | X | X | | X | | | |
| Sustancias químicas Inorgánicas | X | | X | X | X | | | X | X | | X | | | |
| Fertilizantes | X | | X | X | X | | X | X | X | | | | X | |
| Refinería del petróleo | X | | X | X | X | | X | X | X | | | | X | |
| Papel | | | | | X | | X | | X | | X | | X | |
| Curtidurías | | | | | X | | | | | | | | | |
| Textiles | | X | | | X | | | | | | | | | |
| Electrónicos | | X | | | | | X | | | | X | | | X |

Fuente: Lester, 1987.

Tabla 2.6 Principales metales pesados presentes en desechos industriales.

En un cuerpo de agua natural determinado, el plomo se distribuye en tres compartimentos principales: la biomasa orgánica, las partículas suspendidas (orgánicas e inorgánicas) y los sedimentos; en dos reservorios activos ambos disueltos que son los compuestos orgánicos y los inorgánicos. En estudios recientes se ha identificado otro reservorio activo, ubicado en la interfase agua-aire. El plomo puede entrar al reservorio biomasa, en forma de ion soluble, como moléculas organometálicas o con las partículas. En este almacén habrá un aumento progresivo del plomo a medida que el mismo es reciclado hacia los niveles superiores de la

cadena alimentaria. Así el zooplacton asimila al fitoplacton, que en general tiene propensión a absorber el plomo de las soluciones. El zooplacton es a su vez devorado por otros animales más grandes y en muchos organismos este metal se almacena en los huesos (Pérez y Deleón, 1993). En el caso de las plantas acuáticas, en donde la absorción se realiza por toda la superficie de la planta, no hay translocación, pero la bioacumulación variará de acuerdo a las características de cada especie y a la cinética de su crecimiento. El Pb se acumula en las plantas acuáticas y en otros organismos acuáticos en forma de compuestos orgánicos de tipo alquílico. Este hecho es importante si consideramos que a través de la cadena trófica pueden llegarse a envenenar los animales acuáticos y contaminarse ocasionalmente el hombre. Al Pb no se le reconoce algún papel como elemento esencial para el funcionamiento de los sistemas biológicos. El mecanismo tóxico del Pb está dado por tres modalidades: una es compitiendo con los metales esenciales -especialmente el calcio y el zinc- en sus sitios de inserción. Otra es mediante su afinidad por los grupos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas, lo que provoca una alteración de la forma y de la función de las mismas. Dado que numerosas proteínas- entre ellas diversas enzima- poseen grupos -SH, las alteraciones fisiológicas pueden ser muy importantes en el organismo. Finalmente, actúa también alterando el transporte de iones esenciales. A nivel de membrana el Pb^{2+} se une firmemente *in vitro* a la fosfatidilcolina. Sin embargo, los compuestos orgánicos del Pb no han sido observados en sistemas similares (Vallee y Ulmer, 1972). El Pb inhibe además la síntesis de las porfirinas cuyo papel en la génesis de la molécula de clorofila es clave. Las tres enzimas que inhibe son: la ácido γ amino-levulónico deshidratasa; la porfobilinogenasa y la ácido γ a-l- sintetasa (Hamp y Ziezler, 1974).

II.5 Efectos clínicos del plomo

La interferencia causada por el Pb se produce en algunas etapas enzimáticas de la biosíntesis del grupo hemo, en la utilización del Fe, así como en la síntesis de globulina en los eritrocitos. La inhibición de la enzima deshidratasa del ácido delta aminolevulínico (AA-L), de la hemosintetasa y la acumulación en el organismo de los sustratos de estas enzimas está bien documentada. La alteración (inhibición y estimulación) de la enzima sintetasa del ácido delta aminolevulínico (AAL-S) y la inhibición de las enzimas de la transformación del coproporfirinógeno III en protoporfirina IX, constituyen otros mecanismos de interferencia.

Dichas interferencias tienen lugar en la médula ósea, en donde se observa una alteración de la producción de la hemoglobina y una estimulación de la eritropoyesis. En el laboratorio, estos efectos pueden observarse mediante el análisis de la orina y la sangre.

Se ha verificado experimentalmente un efecto sinérgico entre el plomo y el cadmio en lo que se refiere a la teratogénesis. También se ha comprobado un efecto antagónico del zinc con la depresión de la actividad de la enzima deshidratasa del ácido delta aminolevulínico (AA-L) causada por el plomo (Corey y Galvao, 1989).

II.6 Las macrofitas acuáticas en la remoción de metales pesados y otros compuestos de aguas contaminadas

La hidrofita *Lemna* spp. ha sido comparada con otras plantas acuáticas, como *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Hydrocotyle umbellata*, *Spirodella polyrhiza*, *Azolla caroliniana*, *Salvinia rotundifolia* y *Egeria densa*, de entre todas la *Lemna* spp. manifestó una tasa mayor de remoción de fósforo (Reddy, 1985; Wang, 1990).

Se han comparado también varios clones del complejo *Lemna gibba-Lemna minor*, (Porath, 1979), y en cuanto a su composición de aminoácidos y contenido proteico, se ha encontrado que no varían significativamente entre ellas Sin embargo, si superan el contenido de estos compuestos en otras macrofitas, ya que poseen un 30% de proteína cruda. La producción de biomasa en el complejo antes señalado se evaluó, dando como resultado que *Lemna gibba* L. tiene valores más elevados. En otros procesos de tratamiento de aguas ha sido usada *Lemna spp* con resultados satisfactorios (Culley, 1981; Reddy, 1985; Kawabata, 1986; Oron, 1986, 1989, 1990; Zirscky y Reed, 1988; Edwards, 1992). Heisey (1982), estudió en tres diferentes ríos interconectados y sujetos a diferentes influencias humanas la absorción de cobre y plomo en plantas acuáticas de tres formas de vida diferentes: sumergidas, con hojas flotantes y emergentes. Dicho autor encontró que para el Pb, las diferencias encontradas están regidas por la absorción a partir de los sedimentos y por el aporte atmosférico. Las diferencias en las cantidades de Pb en las diferentes formas de plantas fue bajo entre los tres ríos.

Rodgers (1978), utilizó a *Lemna perpusilla* Torrey en lagunas de regulación para remover elementos tóxicos, como el Hg y el Se entre otros, los que fueron exitosamente concentrados en los tejidos de la planta acuática. Benda (1991), analizó la capacidad de *Lemna spp* para

acumular Cu y observó que el contenido de este metal en la biomasa de *Lemna spp* es una función burdamente lineal de su concentración en el medio.

Chawla, (1991) revisó el efecto del pH y la temperatura sobre la remoción de Cd por *Lemna minor* L., encontrando que el pH óptimo de remoción era de 7.5 y que las plantas de la familia Lemnacea abaten el Cd del medio según el tiempo de contacto. La capacidad de remoción de metales pesados, como cromo, talio, plomo, zinc y cobre por *Lemna spp.*, ha sido también estudiada por otros autores con resultados positivos (Staves y Knaus, 1985; Jain, 1988; Kwan, 1988 y 1991).

Como removedor biológico de amonio Porath (1982) *Lemna gibba* L. actúa en notable eficiencia ya que remueve el 80% de su contenido en el medio en 48 horas. Oron, (1987; 1990) plantea diversas consideraciones económicas sobre el uso de *Lemna gibba* L., en el tratamiento de aguas de desecho. Bajo condiciones adecuadas la calidad de los efluentes tratados con esta hidrófita, cumplen con los criterios para su reuso en irrigación. La producción anual (peso seco) de biomasa de esta planta acuática, cosechándola 2 a 3 veces a la semana, es aproximadamente de 55 t/ha.

Shuangxi y Wang, (1991), probaron la efectividad de *Lemna gibba* L. junto con otras macrófitas acuáticas en la purificación de las aguas de desecho de un hospital. Los mismos estimaron que la remoción de contaminantes es más rápida, la concentración de oxígeno disuelto en el agua se incrementa notablemente, disminuye la cantidad de bacterias totales y existe una correlación entre la eficiencia de purificación y la actividad enzimática de las plantas.

Huebert y Shay (1992), probaron la acción del EDTA sobre la remoción del Cd y del Zn por *Lemna trisulca* L observando un efecto antagónico del quelato EDTA con dichos metales. El lirio acuático *Eichhornia crassipes* (Mart. y Solms) Huds; ha sido el vegetal preferido para los estudios de tratamiento biológico de aguas residuales (Gupta, 1982; Muramoto, *op cit.*; Miner 1971; Wolverton, 1975, 1978 y 1979). Sin embargo, las ventajas que sobre esta hidrófita presenta *Lemna spp.*, son entre otras que los nutrientes son absorbidos en el lirio acuático a través de un sistema radical central, mientras que en *Lemna gibba* L. se absorben directamente por cada fronda. Además cuando baja la temperatura, la remoción de los mismos por *Eichhornia* es lenta, lo que no sucede con *Lemna gibba*. Las lemnáceas son capaces de asimilar directamente moléculas orgánicas, como carbohidratos y varios aminoácidos. La remoción del amonio sobre los nitratos, es mayor y esto es esencial para una síntesis de aminoácidos asociados con menor energía .(Porath, 1982). La lignina y la celulosa contenidas son del 2.7 al 10% del peso seco en *Lemna gibba* L.; comparado con el 6 al 21.5% para el lirio acuático (*Eichhornia crassipes* Mart. & Solms.). *Lemna gibba* L. forma natas flotantes de fácil cosecha, mientras que el lirio acuático hay que separarlo y picarlo. El lirio acuático, tiene un valor nutritivo bajo y baja digestibilidad, un costo elevado de cosecha e incrementa la pérdida de agua por evapotranspiración. *Lemna gibba* L. por el contrario tiene un uso extenso como forraje para aves de corral, ganado porcino y peces herbívoros. Otro aspecto importante a tomarse en cuenta, es el que *Lemna gibba* L. crece en cualquier cuerpo de agua dulce, sin importar la profundidad, ni la extensión del mismo, lo cual brinda una buena disponibilidad de la planta en cualquier zona de clima templado. En los Estados Unidos de Norte América el uso de *Lemna spp.* para cubrir las lagunas en el postratamiento terciario es reconocido por la EPA como una alternativa de innovación tecnológica (Ngo Viet, 1987). PRISM Bangladesh, organismo no gubernamental ha desarrollado desde 1990

una laguna con *Lemna spp* que recibe agua doméstica de una población de 2000-3000 habitantes (Skillicorn, 1993). Este es el único sistema a escala técnica que ha sido operado en una forma semiprofesional durante 4 años continuos. La laguna ha operado sin percances siendo utilizada la cosecha de *Lemna* en piscicultura.

Lemna gibba L. es una planta de crecimiento muy rápido. Se reporta en condiciones de laboratorio que en 0.7 días, puede duplicar su biomasa con un aporte de nutrientes óptimos y las condiciones de luz y temperatura (18° a 29° C) adecuadas. Debido a su flotabilidad es especialmente susceptible a las sustancias activas presentes en la superficie las cuales se concentran en la interfase aire -agua (Wang, 1990).

II.7 Características botánicas, anatómicas y distribución mundial de *Lemna gibba*

Pertenece a la familia Lemnaceae, *Lemna gibba*, esta formada por dos partes; fronda y raíz. Presenta un talo solitario o pocos en grupo, orbicular-obovado de 2.5 mm de largo, 2-4 mm. de ancho, con dos capas de espacios aéreos verde oscuro por arriba y frecuentemente sombreado con rojo por debajo. Tiene una ligera joroba y de 1 a 3 nervaduras por arriba, conspicuamente redondeado, usualmente giboso e inflado en el lado ventral debido al engrandecimiento de las capas de espacios aéreos. Cuando estas son muy grandes el talo es completamente convexo (Hillman, 1961) (Figura 2.2). Linneo describió a *Lemna gibba* en 1753, en su obra *Species Plantarum*, y le dio el nombre de "gibba" debido al caracter giboso de las frondas. Lo voluminoso de las frondas se debe a un engrosamiento vertical de los espacios aéreos, los que pueden variar notablemente bajo la influencia de factores externos. *Lemna gibba* en ocasiones presenta formas aplanadas que no varían mucho morfológicamente con la especie *Lemna minor* L. por lo que es común confundirlas. Pieters

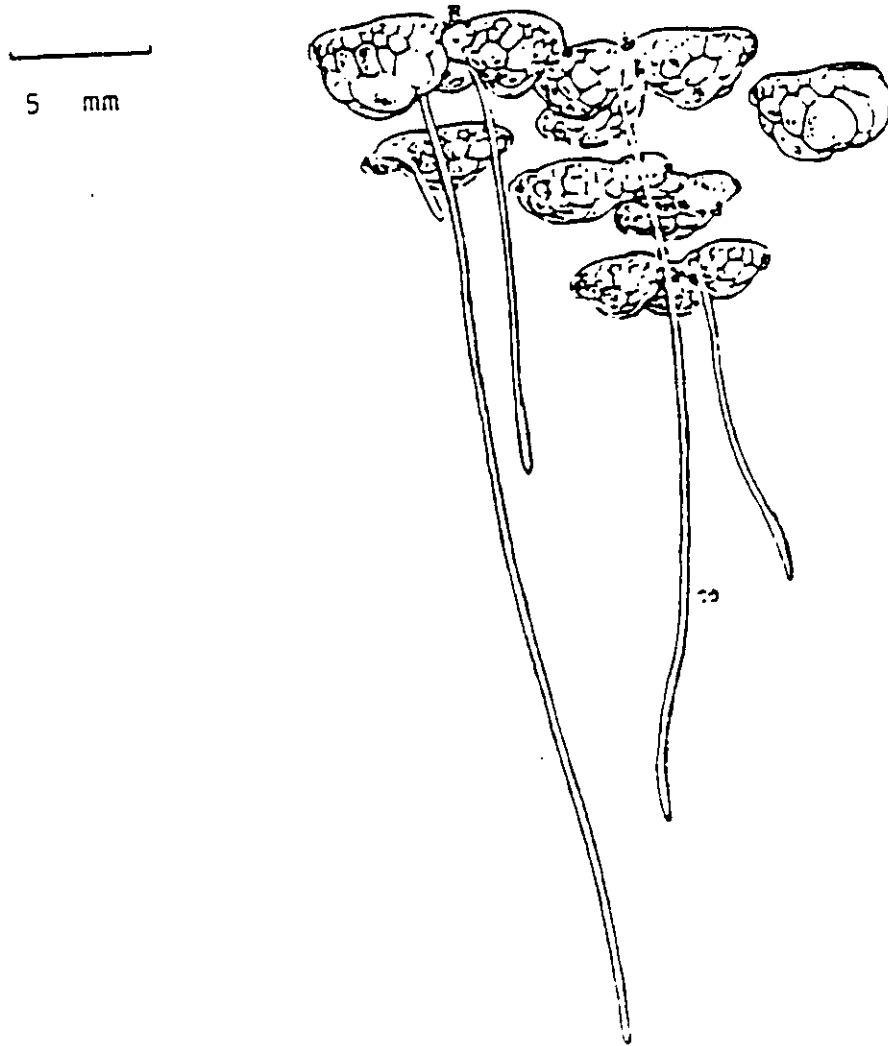


Figura 2.2 *Lemna gibba* L.

(1975), señala que desde 1969 Van Horen reporta frondas aplanadas producidas a partir de formas gibosas, como resultado del cambio de estación de calor a frío. El mismo Pieters apunta que Guppy ya en 1895 encuentra que las frondas gibosas dan lugar a hijas aplanadas al final del verano y concluye que la temperatura regula la formación de formas gibosas.

Durante la última mitad del Siglo XIX, hay muy pocos estudios sobre la morfología de *Lemna gibba* L. De Lange y Segal (1968) proponen que las formas gibosas se formaban bajo condiciones óptimas de crecimiento, mientras que las formas aplanadas, se forman en condiciones subóptimas, cuando el contenido de cloro en el agua es significativo, o hay eutroficación. La marcada reducción en el tamaño y la forma de *Lemna gibba* L., está acompañada por una gran simplificación de su estructura anatómica. El tejido parenquimatoso del talo tiene unas cuantas capas de células con grandes espacios intercelulares y ambas epidermis la superior y la inferior contienen numerosos cloroplastos. La superficie de la epidermis superior presenta una cutícula muy delgada que posee estomas. En la parte inferior el talo se hincha de manera pronunciada dando lugar a una forma convexa a causa de una masa de tejido esponjoso. El agua corriente y temperaturas medias diarias de 21 °C favorecen el desarrollo de este tejido esponjoso. En muchas especies se acumulan cristales de oxalato de calcio, los que se depositan como rafidios en las células parenquimáticas del talo, en la corteza de la raíz y en la epidermis. Las antocianinas se presentan en ocasiones en una o en ambas capas epidérmicas, lo que le confiere a la planta una pigmentación café. *Lemna gibba* L., no presenta sistema vascular. Cada talo muestra típicamente una dorsiventralidad simple, correspondiendo el xilema a la superficie superior y el floema a la inferior. La endodermis no es distinguible. Los vasos están ausentes en todos los miembros de la familia Lemnaceae, las raíces son simples, no ramificadas y en forma

3 mm

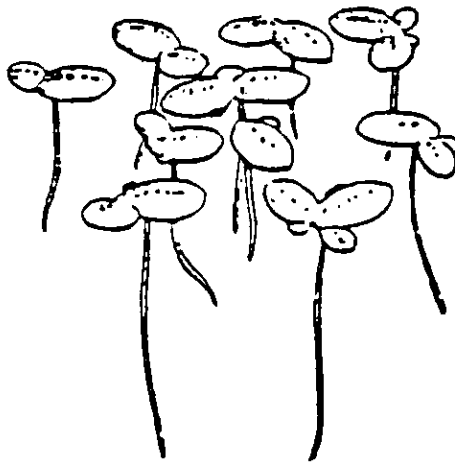


Figura 2.3 *Lemna minor* L.

capilar. Su anatomía evidencia una reducción extrema y están desprovistas de tejido vascular. Las plantas absorben los nutrientes tanto a través de la raíz, como de la superficie inferior del talo (Sculthorpe, 1966).

La fronda, la estructura que todas las lemnáceas presentan, producen nuevas frondas “hijas” a partir de dos bolsas pequeñas situadas a cada lado de la parte terminal angosta de una fronda vieja “madre”, muy cerca de la parte de inserción con la raíz. Cada fronda madre produce un numeroso grupo de frondas hijas, para dar lugar a lo que se pudiera llamar una colonia. Las frondas hijas se producen de modo alterno, de un lado al otro, desarrollándose primero una bolsa y luego otra. Cuando ocurre la floración, la inflorescencia siempre aparece en la fronda menor. La inflorescencia consiste en una flor femenina y una o dos flores masculinas creciendo en el margen de la superficie de la fronda (Goldberg, 1989).

La distribución mundial de *Lemna gibba* L., está limitada por la isoterma de 18°C, para los tres meses más fríos del año, hacia regiones frías el límite corresponde a la isoterma de enero de -1°C. En localidades con temperaturas promedio entre -1°C y -5°C, las colectas de *Lemna gibba* son muy escasas. Como regla general *Lemna gibba* se presenta únicamente en regiones con un promedio de precipitación anual menor a los 90 mm. La ausencia de *Lemna gibba* en el sureste, este y noroeste de los Estados Unidos de Norteamérica, es debida a sus altos niveles de precipitación en dichas regiones. La ausencia de este taxón en el norte y centro de Norteamérica, en el norte de Europa, así como en el centro y norte de Asia es causado por las bajas temperaturas de invierno que presentan estas regiones (Figura 2.3).

A continuación se dará la distribución de *Lemna minor* debido a que muchos trabajos de investigadores norteamericanos usan esta especie. La distribución de *Lemna minor* (Figura



Figura 2.4 Distribución de *Lemna gibba* L.
[Landolt, 1975].

2.4) está limitada por la isoterma de 15°C en los tres meses más fríos del año. Por otra parte, esta especie no se observa en regiones con veranos fríos. Los límites coinciden aproximadamente con la isoterma de 10°C para los tres meses de verano. En regiones áridas donde habita *Lemna gibba* L., *Lemna minor* es muy rara o totalmente ausente. La distribución de *Lemna minor*, es atribuible a su alta tolerancia climática. El área ocupada por la especie se extiende hacia la mayoría de las regiones frías (Figura 2.5), puede por tanto concluirse que los factores que influyen en la distribución de ambas especies, son la temperatura, la desecación, una salinidad elevada de agua, y baja concentración de nutrientes (Landolt, 1975).

Lemna gibba L. es abundante en los cuerpos de agua del Valle de México, por lo que fue posible su obtención en los canales de Xochimilco, D. F.

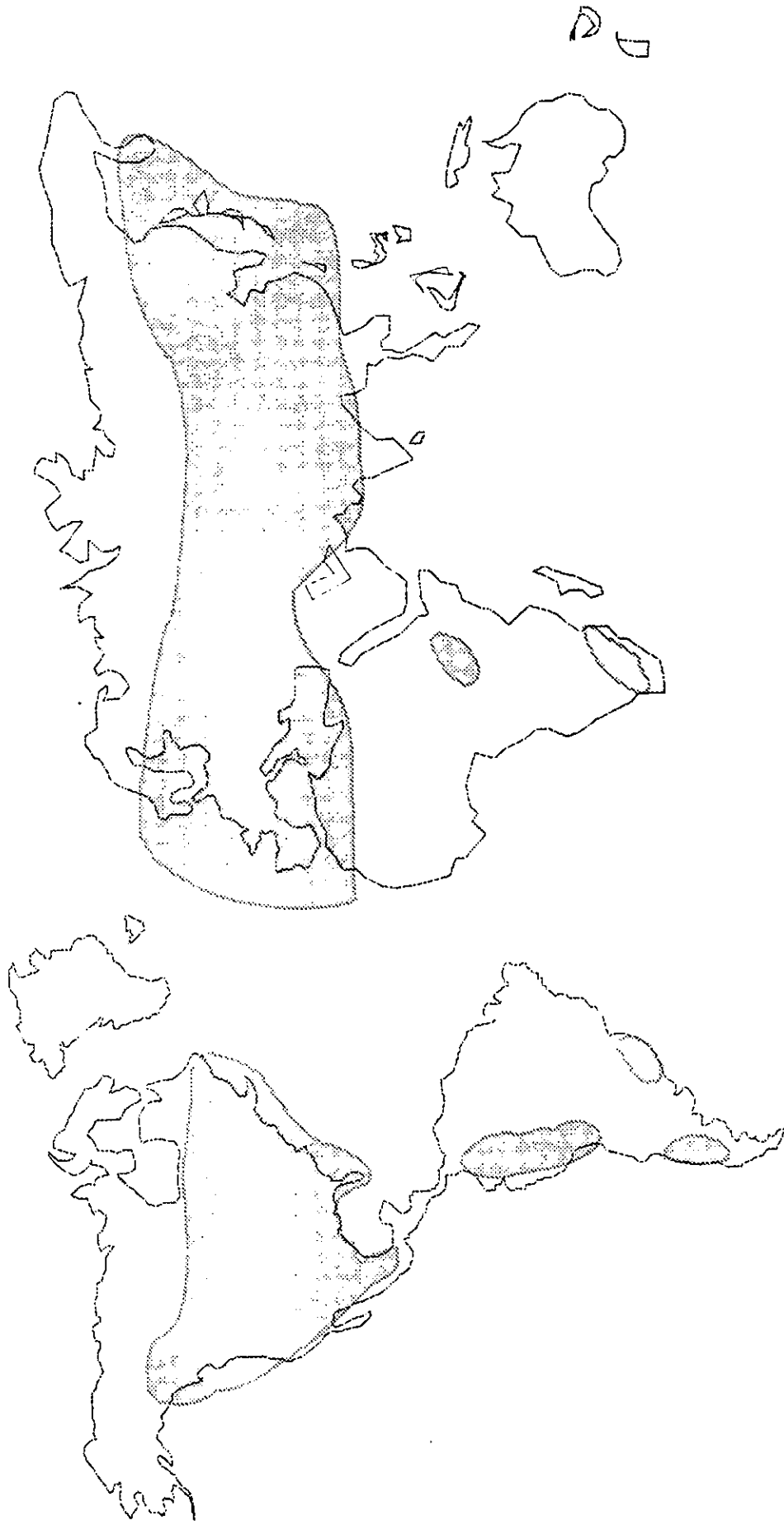


Figura 2.5 Distribución de *Lemna minor* L.
(Landolt 1975).

III. MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares de *Lemna gibba* se colectaron en el Canal Nacional, Xochimilco, D. F., y se mantuvieron en estanques a la intemperie en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, plantel Iztapalapa (Figura 3.1).

Todo el trabajo se realizó en invernadero, con una intensidad lumínica de $21 \mu\text{E. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y un intervalo de temperatura cuyos valores extremos estuvieron comprendidos entre 20 y 30°C.

Se preparó medio nutritivo Hoagland (Penningsfeld y Kurzman, 1975), teniendo un volumen de 1.5 l en cada lote con tres repeticiones; se utilizaron recipientes de plástico rectangulares; las plantas se lavaron con agua destilada antes de colocarlas en los recipientes plásticos, cada lote contenía cinco gramos de peso fresco.

Elementos de la solución nutritiva

(para 1000 ml)

1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ----- 5 ml/l

1 M KNO_3 ----- 5 ml/l

1M MgSO_4 ----- 2 ml/l

0.1 M FeEDTA ----- 1 ml/l

Micronutrientes (1 ml)

g/l

H_3BO_3 ----- 2.86

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ----- 1.81

ZnCl_2 ----- 0.11

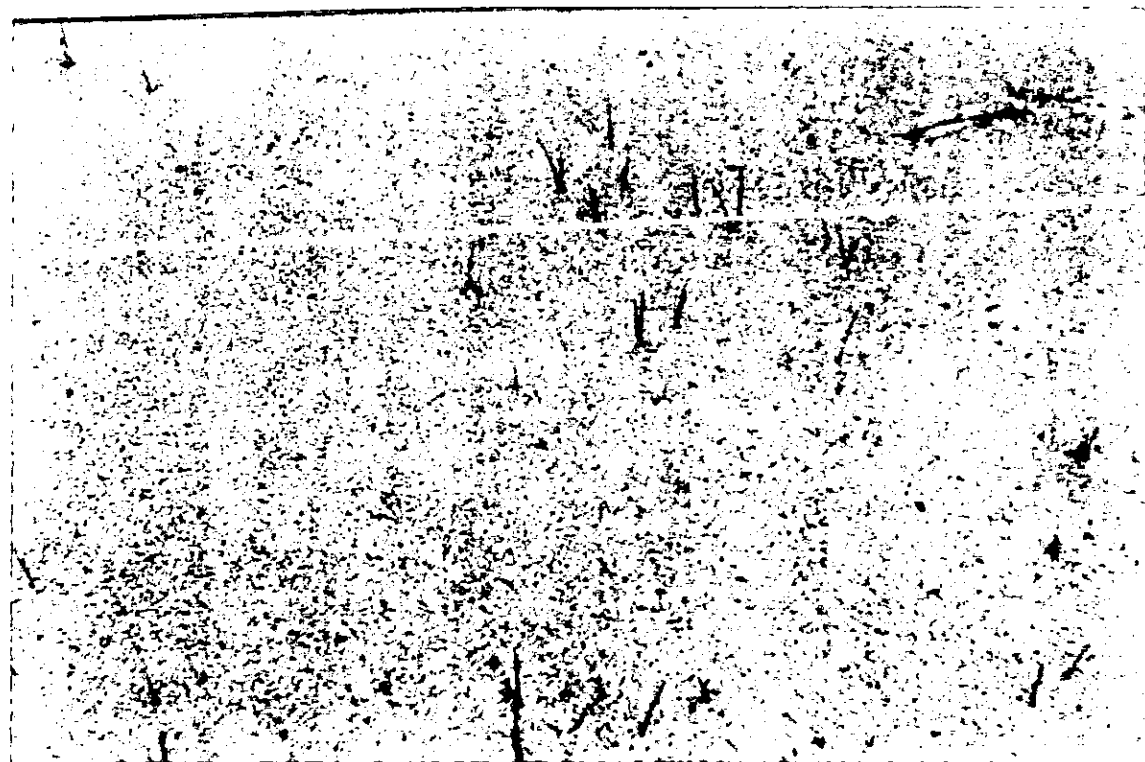
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----- .025

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ----- .05

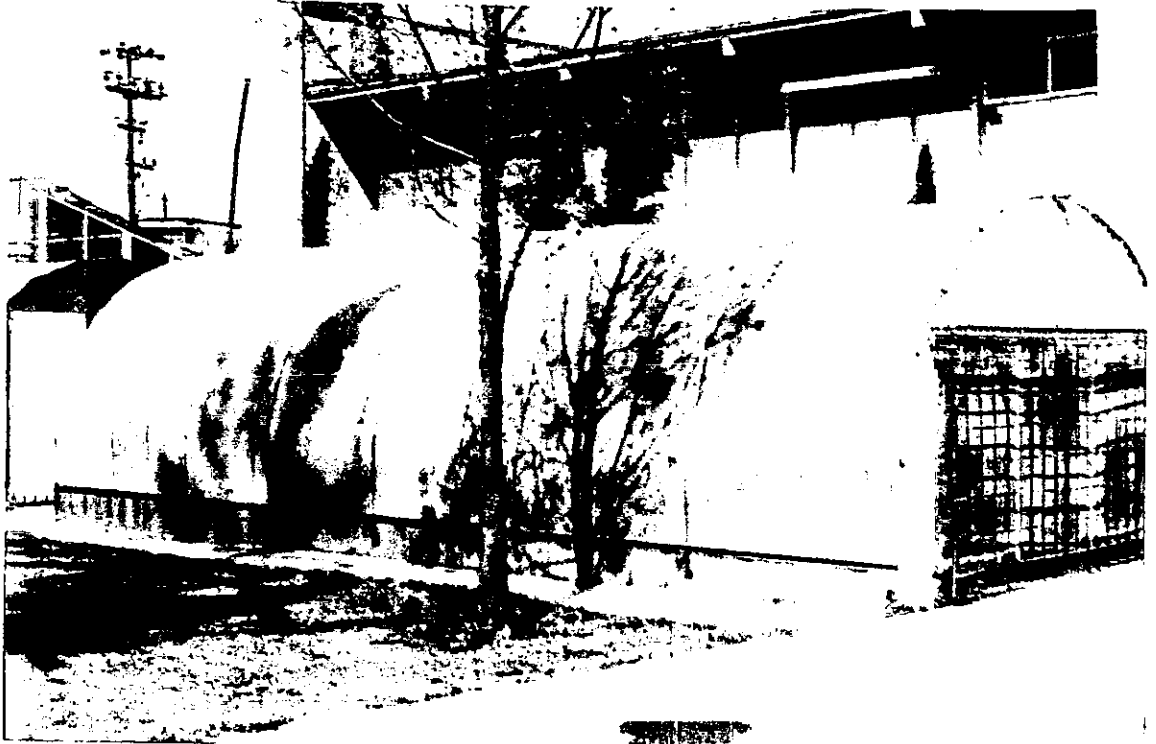
Figura 3.1 (a) Canal Nacional, Xochimilco, D.F.; (b) población de *Lemna gibba*; (c) invernadero de la UAM-Iztapalapa; (d) recipientes plásticos con los tratamientos.



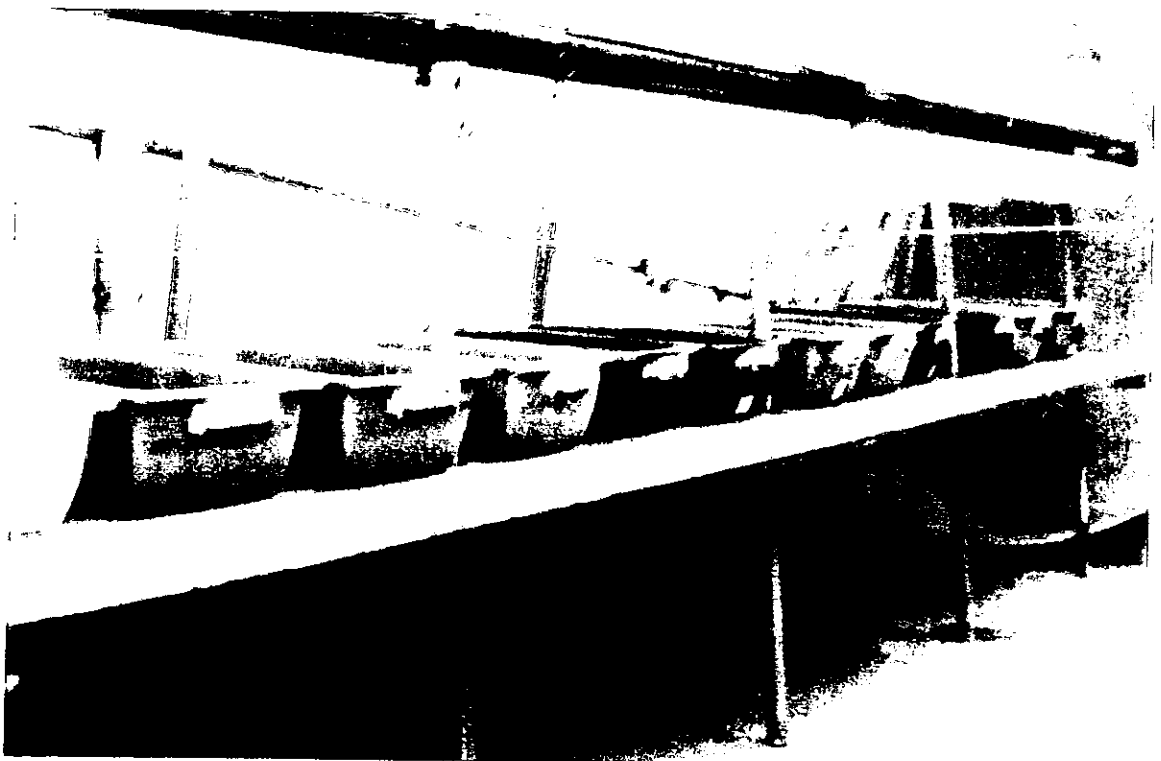
(a)



(b)



(c)



(d)

III.1. Diseños de Experimentos.

Con el objeto de definir la acción del Pb sobre el crecimiento y el metabolismo de *Lemna gibba* para establecer las normas de manejo de la planta como agente detoxificador, se ejecutaron cuatro experimentos con tres repeticiones y en todos ellos un testigo sin el elemento. El Pb se agregó en forma de nitrato de plomo $Pb(NO_3)_2$.

III.1.1 Efecto de la concentración de Pb sobre la viabilidad de *Lemna gibba* (experimento 1).

Se probaron las concentraciones 2, 4, 6 y 8 ppm de Pb contra un testigo sin dosificación del elemento. Los valores seleccionados son representativos de las concentraciones reportadas del elemento en aguas contaminadas (Pérez y Deleón, 1993).

Los ensayos se llevaron a cabo bajo iluminación continua (24 h luz) durante un periodo de cultivo de 26 días. Con el fin de precisar la acción del elemento tanto a nivel metabólico, como a escala global de la planta, se determinó su tasa de crecimiento relativo (R), los contenidos de clorofilas a, b y total, así como la concentración de fenoles totales. Se cuantificó además el contenido de Pb en el tejido vegetal de *Lemna gibba*, posteriormente se preparó medio nutritivo con concentraciones de Pb de 100, 200, 400, 800 y 1600 ppm y bajo las mismas condiciones experimentales se cuantificó su crecimiento.

III.1.2 Efecto del período de iluminación sobre el crecimiento y adaptación de *Lemna gibba* a la presencia de Pb en el medio (Experimento 2).

Se preparó medio nutritivo de igual composición pero con concentraciones de 30, 50, 100, 200 y 500 ppm de Pb. El experimento se llevó a cabo en condiciones similares a las de los dos ensayos anteriores pero bajo regímenes lumínicos deferentes: en luz continua (24 h de iluminación) y con fotoperíodo de 12:12. Durante un período de siete días se evaluó la tasa de crecimiento (R), además de los mismos factores bioquímicos de experimento anterior, se

cuantificó el Pb tanto en el tejido vegetal, como en el medio nutritivo al tercer día de iniciado el experimento.

III.1.3. Efecto de la concentración de nutrientes sobre el crecimiento de *Lemna gibba* bajo diversas concentraciones de Pb (Experimento 3).

Se evaluó el crecimiento de *Lemna gibba* durante un período de 13 días, en diluciones 1:20, 1:40 y 1:50 del medio nutritivo Hoagland y bajo concentraciones de Pb de 50, 100, 200, 300 y 500 ppm.

III.1.4 Efecto del Pb sobre algunos componentes bioquímicos del metabolismo intermediario (Experimento 4).

Con una dilución 1:40 del medio nutritivo, un fotoperíodo 12:12 y concentraciones de Pb similares a las del experimento anterior., durante trece días se midió la tasa de crecimiento (R). Se estimaron diariamente durante siete días el contenido de plomo en el tejido vegetal, así como el contenido residual en el medio nutritivo. Se determinó a las 72 horas de iniciada la experiencia, el contenido de clorofilas a, b y total, así como los siguientes factores bioquímicos: proteínas solubles totales, aminoácidos libres totales, almidón soluble total, azúcares libres totales y fenoles totales.

III.2 Métodos Analíticos.

III.2.1 Cuantificación de la concentración de plomo Pb.

a) En las plantas

Los ejemplares de plantas se secaron en horno a 60°C, posteriormente se molió el material vegetal en un mortero ágata, se pasó por un tamiz de 1 mm de abertura. Se pesaron 0.5 g de este material, se agregaron 7 ml de ácido nítrico (HNO₃) y se calentó hasta sequedad, se

agregaron 2 ml de ácido perclórico (HClO_4), calentando durante una hora, se dejó enfriar, se agregaron 25 ml de agua desionizada y se filtró en papel Whatman No. 42, se llevaron a un volumen de 50 ml con agua destilada y se leyó en Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Perkin-Elmer Mod. 2380.

b) En el medio nutritivo

Las muestras de medio nutritivo se filtraron con papel Whatman No. 42, se agregó 0.1 ml de ácido nítrico (HNO_3), para estabilizar el pH y se leyó en el Espectrofotómetro antes mencionado (APHA, 1992).

III.2.2 Extracción de Azúcares Libres Totales, Aminoácidos Libres Totales y Fenoles Totales.

Un gramo de peso fresco de la planta se homogeniza con 10 ml de etanol al 80% en un mortero de porcelana, el homogenado se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recoge y el residuo se re-extrae dos veces más con el mismo solvente. Los sobrenadantes se mezclan y se utilizan para las determinaciones de azúcares libres totales, aminoácidos libres totales y fenoles totales.

III.2.3 Cuantificación de Azúcares Libres Totales

A 1 ml de la muestra extraída con etanol al 80% se agregó 1 ml de fenol al 5% (v/v) y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, agitando la mezcla en tubos en hielo, se llevó a un volumen final de 15 ml con agua bidestilada, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Spectronic 2000, BAUSCH & LOMB, USA) a 490 nm. Se usó glucosa como standard (Dubois et al, 1956).

III.2.4 Cuantificación de Aminoácidos Libres Totales

A 0.1 ml de la muestra arriba señalada (extraída en etanol al 80%), se agregaron 5 ml de Ninhydrina al 5% (p/v), pasándose a baño a ebullición por 10 minutos. Se dejó enfriar la mezcla y se llevó a un volumen de 10 ml con etanol al 60% (v/v). La absorbancia se leyó a 570 nm. en espectrofotómetro (Spectronic 2000, BAUSCH & LOMB, USA). La concentración de aminoácidos se determinó usando D-Leucina como estandar (Troll y Canan, 1953).

III.2.5 Cuantificación de Fenoles Totales

Se tomó 1 ml de la muestra (extracto en etanol 80%), al que se agregaron 3 ml de reactivo de Folin-fenol al 10% y 1 ml de solución saturada de NaHCO_3 . La reacción de mezcla se guardó a 50°C en estufa por 30 minutos. La absorbancia se leyó a 660 nm en el mismo espectrofotómetro antes mencionado. Se usó catecol como estandar (Swain y Hillis, 1959).

III.2.6 Cuantificación de Almidón Soluble Total

El residuo de las centrifugaciones del material vegetal extraído con etanol 80%, se utilizó en esta determinación, a la que se le agregaron 6.5 ml de ácido perclórico (HClO_4) al 52% (APC) y 5 ml de agua destilada, la mezcla se guardó por 20 minutos a 0°C, para posteriormente centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se guardan y se procedió a la re-extracción con el mismo volumen de la mezcla de solventes mencionada, los sobrenadantes se combinan, de estos últimos se tomó 0.5 ml de muestra, se agregaron 4.5 ml de agua destilada y 10 ml de antrona disuelta en ácido sulfúrico H_2SO_4 al 95%, este paso se realizó en un baño de hielo pues es una reacción exergónica. Las muestras se llevaron a baño a ebullición durante 15 minutos, después de lo cual se dejaron enfriar a temperatura ambiente para proceder a su lectura en el espectrofotómetro a 630 nm. El almidón soluble total se calculó usando glucosa como estándar (McCready et al, 1950).

III.2.7 Cuantificación de Proteínas Solubles Totales

Se tomó un gramo peso fresco de planta y se homogeneizó en mortero de porcelana con 10 ml de agua destilada, el homogenado se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se colectó y el residuo se re-extrajo. De los sobrenadantes combinados se tomó 1 ml y se le agregó 1 ml de $C_2HCl_3O_2$ ácido tricloroacético (ATC) al 10% y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se desechó y el precipitado se disolvió en 5 ml de hidróxido de sodio NaOH .1N De esta solución se tomaron 0.5 ml de muestra y se le agregaron 2 ml de reactivo "A" agitando en vortex, se dejaron reposar 10 minutos y se agregó 0.2 ml del reactivo "B" agitando en vortex se dejó reposar 30 minutos para después leer a 750 nm en espectrofotómetro. Las proteínas solubles totales se calcularon usando albúmina bovina (Lowry et al, 1951).

III.2.8 Cuantificación de Clorofila

Un gramo de peso fresco de la planta se lavó con agua destilada, se dejó secar dos minutos en papel secante, y se homogeneizó en mortero de porcelana con 15 ml de acetona acuosa 80% (v/v), se agregó una pizca de $MgCO_3$. El homogenado se centrifugó a 5000 r.p.m. por 10 minutos usando una centrifuga DAMON/IEC Modelo HN-SII. El sobrenadante se colectó y el residuo se volvió a re-extraer con el mismo solvente hasta que el residuo no retuviera color verde. Ambos se mezclaron y se llevaron a un volumen total de 25 ml con acetona al 80%. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro Spectronic 2000, BAUSCH & LOMB, a 66nm y 645 nm. Los contenidos de clorofilas a y b y clorofila total fueron calculados usando la siguiente fórmula (Arnon, 1949).

$$\text{Clorofila total (mg/gpt)} = \frac{20.2 \times 0.D_{645} + 8.02 \times 0.D_{663}}{a \times 1000 \times w} \times v$$

$$\text{Clorofila a (mg/gpf)} = \frac{12.7 \times 0.D_{663} - 2.69 \times 0.D_{645}}{a \times 1000 \times w} \times v$$

$$\text{Clorofila b (mg/gpf)} = \frac{22.9 \times 0.D_{645} - 4.68 \times 0.D_{663}}{a \times 1000 \times w} \times v$$

donde: a = longitud de la línea de luz en la célula (usualmente 1 cm)

v = volumen de acetona extractante en ml.

w = peso fresco de la muestra en gramos

III.3. Técnicas histoquímicas.

Para el estudio histoquímico se tomaron muestras de plantas al tercer día del experimento, las cuales se conservaron en fijador F.A.A. (formol: 5 ml; ácido acético: 5 ml; y alcohol acuoso 50%:90 ml). Posteriormente se realizaron cortes transversales de 30 μ en las frondas de *Lemna gibba* en microtomo para congelación AMERICAN OPTICAL. Con los cortes se procedió a realizar las técnicas de tinción con base en Krishnamurthy, 1988:

- (a) Tinción de proteínas con eosina
- (b) Tinción de almidón con lugol
- (c) Tinción de fenoles con ácido sulfanílico

Las fotografías se realizaron inmediatamente con las preparaciones frescas montadas en agua. Se utilizó el fotomicroscopio Karl Zeiss, Mod. I.

III.4. Métodos Numéricos.

Los resultados se expresaron en forma de tablas y gráficos empleándose para ello el paquete para computadora personal EXCEL versión 7.0. Se realizó un ANOVA de clasificación simple o múltiple según requiriera el caso, así como un análisis de rango múltiple con este fin se utilizó el paquete STATGRAPHICS versión 7.0.

III.4.1 Medición de la Tasa de Crecimiento Relativo (R).

La (R) se calculó siguiendo la fórmula usada por Porath, et al, 1979

$$R = \frac{\ln (w_t / w_0)}{t}$$

donde: ln = logaritmo natural

w_0 = peso fresco de la planta al tiempo 0 del tratamiento.

w_t = peso fresco de la planta al final del tratamiento.

t = número de días

IV. RESULTADOS

IV.1. Experimento 1

Los valores de la tasa de crecimiento R , de *Lemna gibba* fueron significativos en función del tiempo (ver anexo: tabla 1 ANOVA); el análisis de rango múltiple presentó un sólo grupo homogéneo para los días 22 y 26 (Figura 4.1).

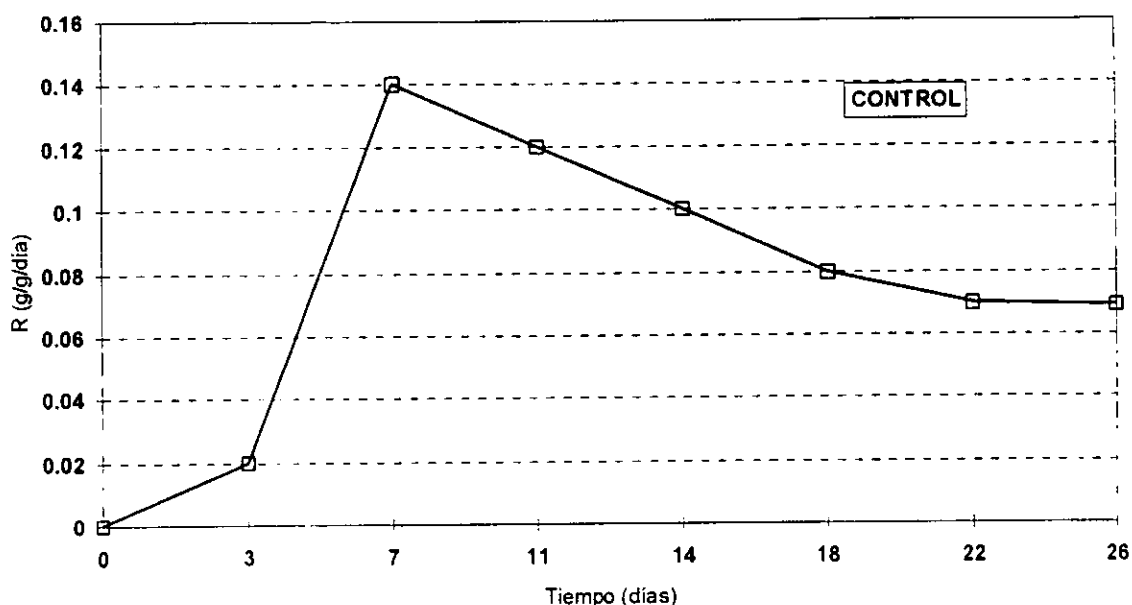


Figura 4.1. Tasa de crecimiento (R) de *Lemna gibba* L. en medio nutritivo Hoagland con luz continua.

Se encontró en los tratamientos 2, 4, 6 y 8 ppm con Pb y el testigo sin el metal, que hubo diferencias significativas (tabla 2 ANOVA), tanto en función de los diferentes tratamientos, como en función del tiempo; el análisis de rango múltiple indicó la presencia de grupos homogéneos entre las concentraciones de 0, 2 y 4 ppm Pb, así como 4, 0 y 8 ppm además en el tiempo en los días 24 y 3; 3 y 20; y 20, 6 y 17 (Figura 4.2).

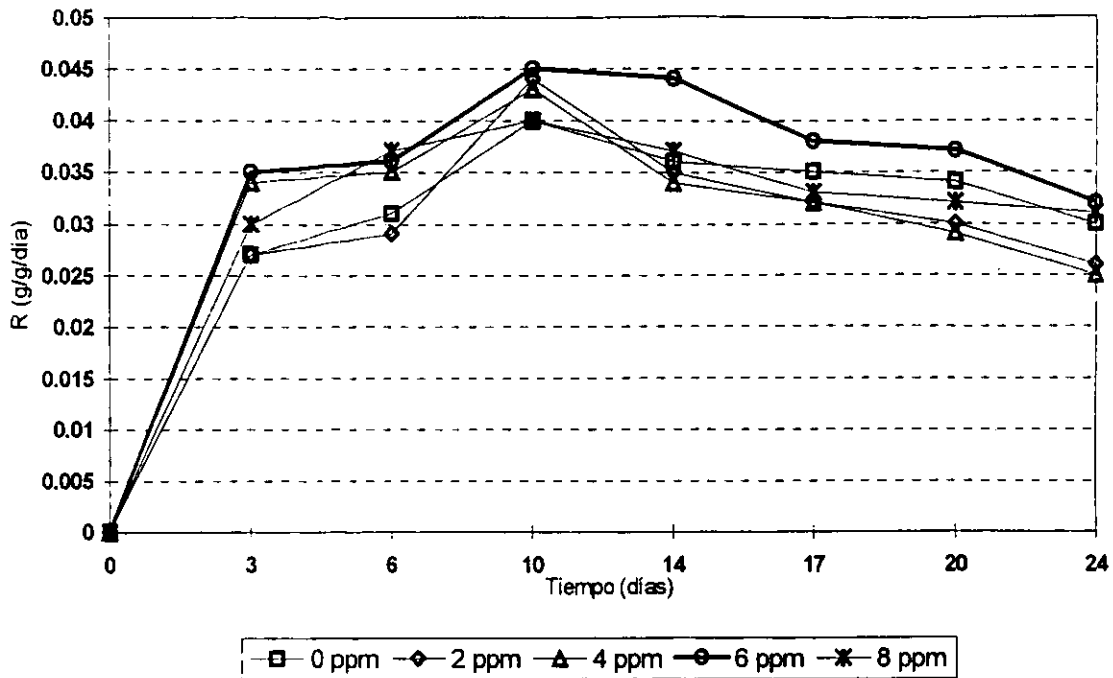


Figura 4.2. Tasa de crecimiento (R) de *Lemna gibba* L. en medio nutritivo Hoagland con Pb con luz continua.

Los contenidos de clorofila a, b y total evaluados al tercer día (Figura 4.3) y al día 26 (Figura 4.4) del experimento presentaron diferencias significativas, tanto en función de los tratamientos con plomo, como en función al tiempo (tablas 3, 4 y 5 ANOVA), el análisis de rango múltiple mostro grupos homogéneos en los tratamientos de 2, 4 y 6 ppm Pb, y otro con el testigo sin Pb y 8 ppm en las tres clorofilas a, b y total en el día 3; y en los tratamientos 4 y 6 ppm Pb para la clorofila a y total al día 26 del experimento.

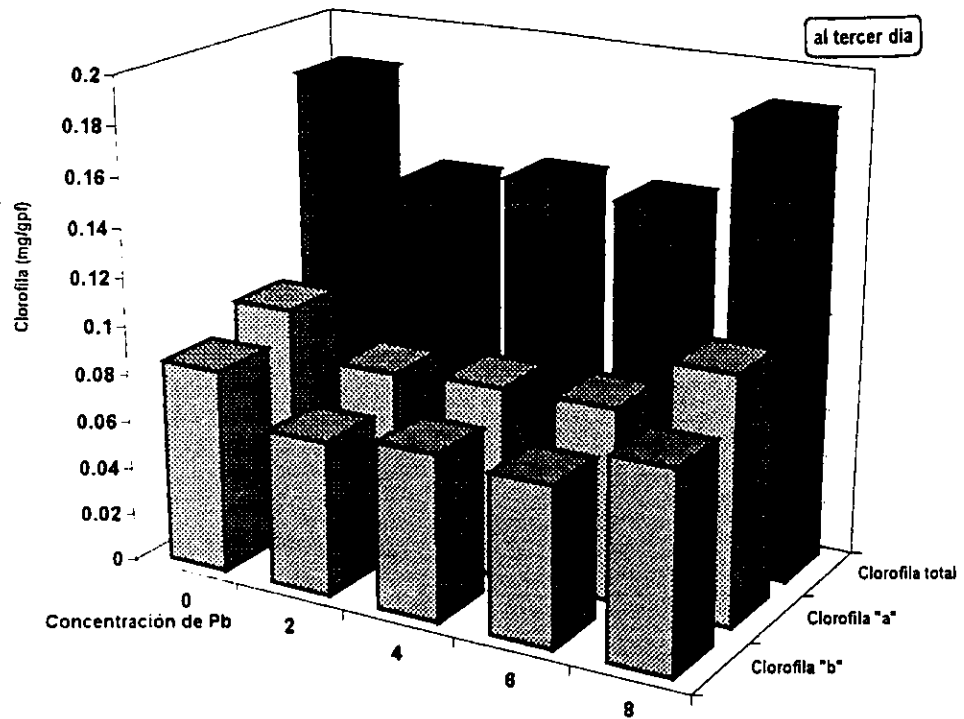


Figura 4.3. Contenido de clorofilas en *Lemna gibba L.* en medio nutritivo Hoagland con Pb con luz continua.

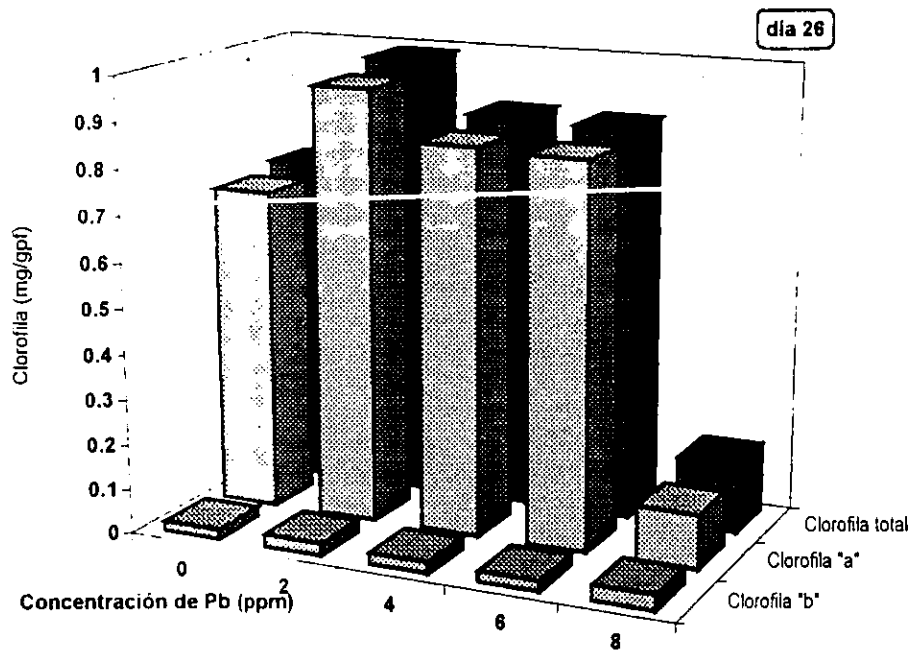


Figura 4.4. Contenido de clorofilas en *Lemna gibba L.* en medio nutritivo Hoagland con Pb con luz continua.

Los fenoles totales determinados al tercer día del experimento (Figura 4.5), mostraron diferencias significativas en función de los tratamientos con Pb (tabla 6 ANOVA); el análisis de rango múltiple no presentó ningún grupo homogéneo.

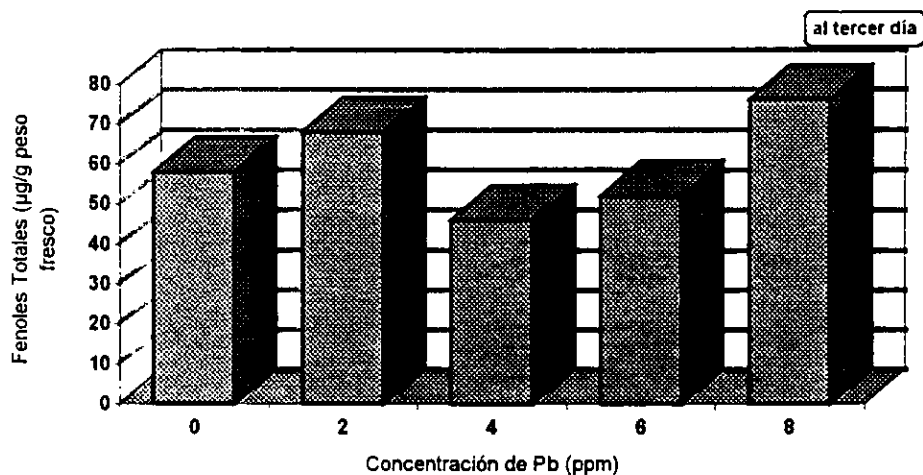


Figura 4.5. Contenido de fenoles en *Lemna gibba* L. en medio Hoagland con Pb en luz continua.

La determinación de plomo en el tejido vegetal de *Lemna gibba* al día 26 del experimento (Figura 4.6) resultó significativa entre los tratamientos y el testigo sin Pb (Tabla 7 ANOVA); el análisis de rango múltiple indicó que no hubo grupos homogéneos. Es importante destacar que en el lote testigo (0 ppm Pb) se detectó una concentración de 439 µg/g peso seco de Pb, debido a que el agua del canal donde se colectaron las plantas contiene Pb derivado de la gasolina usada en lanchas de motor; aunque las plantas se lavaron tres veces con agua destilada, no se eliminó el Pb que absorbido; esto significa que a los datos aquí presentados, debe restárseles el Pb contenido inicialmente, para obtener el plomo neto absorbido.

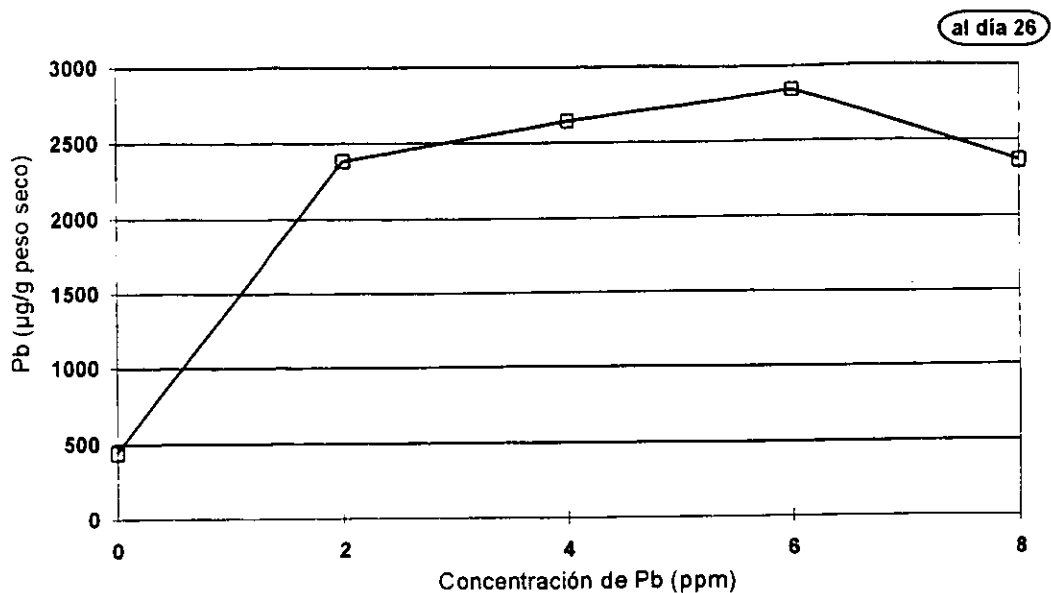


Figura 4.6. Concentración de Pb en *Lemna gibba* L. absorbido del medio Hoagland con luz continua.

De las concentraciones 100, 200, 400, 800 y 1600 ppm no se presentan resultados, debido a que al tercer día de iniciado el experimento hubo mortandad en los lotes de 800 ppm y 1600 ppm Pb, por lo que se suspendió y se procedió a realizar el tercer experimento con concentraciones menores (30, 50, 100, 200 y 500 ppm de Pb).

IV.2. Experimento 2

Los resultados de las tasas de crecimiento en las dos diferentes condiciones de iluminación (continua y discontinua) (Figuras 4.7 y 4.8) coincidieron en los valores máximos al día décimo del experimento en los lotes testigo sin Pb; el análisis estadístico mostró que las diferencias fueron significativas, tanto en función de los tratamientos con Pb, como en función al tiempo (ver tablas 8 y 9 ANOVA). Las diferencias en los datos de los

tratamientos con plomo en función de las dos condiciones de iluminación resultaron significativas de acuerdo con la tabla 10 de ANOVA. El análisis de rango múltiple nos dio en luz continua tres grupos homogéneos, uno que comprende los tratamientos 100 y 500 ppm Pb y otro con 30, 50 y 200 ppm Pb, así como uno más de 0, 30 y 50 ppm. En esta misma condición de iluminación con respecto al tiempo se presentaron grupos homogéneos entre los días: 7, 3, 24 y 21; 24, 21 y 17; 21, 17, 14 y 14 y 10. En iluminación discontinua se presentó un grupo homogéneo que comprende los tratamientos de 50 y 100 ppm de Pb y otro con los tratamientos 0 ppm (testigo) y 30 ppm Pb; con relación al tiempo se mostraron dos grupos homogéneos, uno con los días 24, 3 y 21 y otro con los 3, 21, 17, 14 y 7.

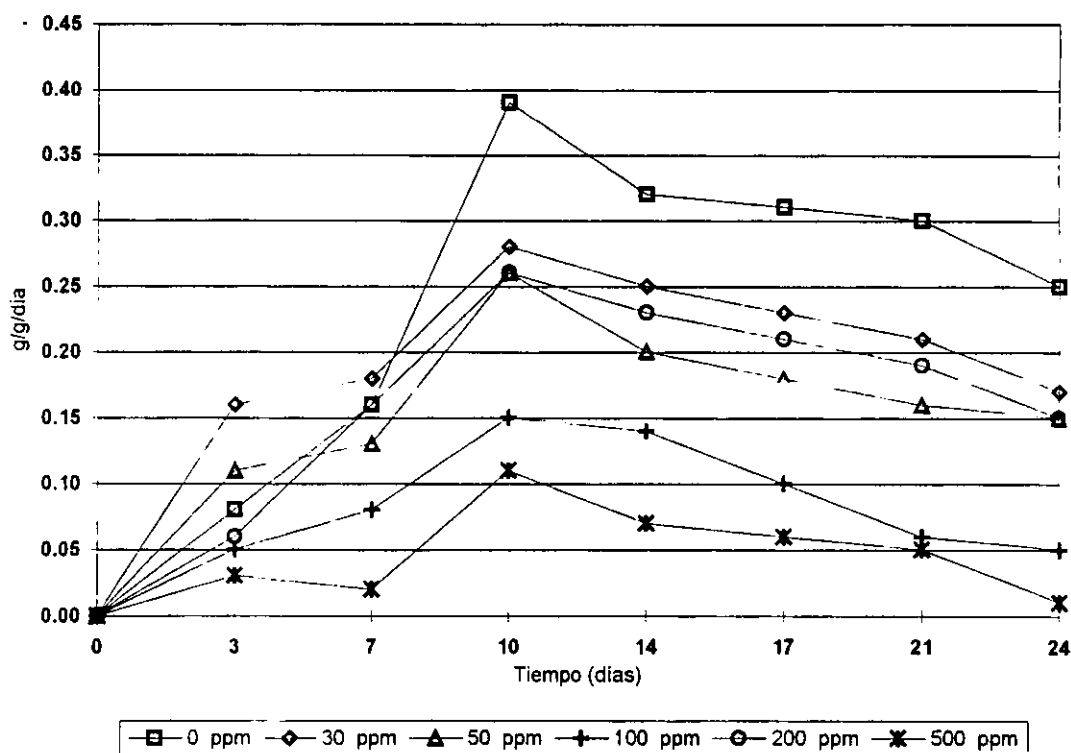


Figura 4.7. Tasa de crecimiento (R) de *Lemna gibba* L. en medio nutritivo Hoagland con Pb en luz continua.

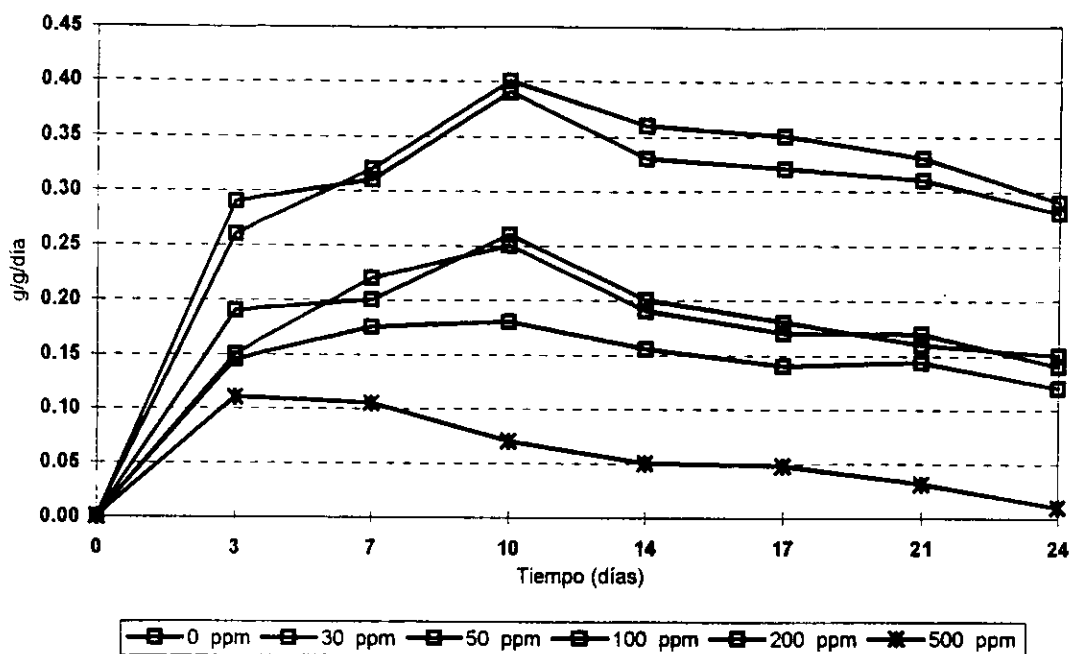


Figura 4.8. Tasa de crecimiento (R) de *Lemna gibba* L. en medio nutritivo Hoagland con Pb en luz discontinua.

El Pb absorbido por el tejido de *Lemna gibba*, (Figuras 4.9 y 4.10) presentaron diferencias significativas (tablas 11, 12 y 13 de ANOVA), tanto en función del tiempo; en función de los diferentes tratamientos con Pb, como en función de las dos diferentes condiciones de iluminación. El análisis de rango múltiple mostró dos grupos homogéneos para la condición de iluminación continua, uno con las concentraciones 30 y 50 ppm de Pb y otro con las concentraciones 100 y 200 ppm Pb; además de dos grupos homogéneos con relación al tiempo uno comprende las 24, 48 y 96 h y otro las 48, 72 y 96 h. Por su parte, en luz discontinua se presentaron grupos homogéneos con las concentraciones 30 y 50; 50 y 100 ppm de Pb, y otro con las concentraciones 100 y 200 ppm Pb; con respecto al tiempo, sólo se presentó un grupo homogéneo que contiene las 24 y 48 h.

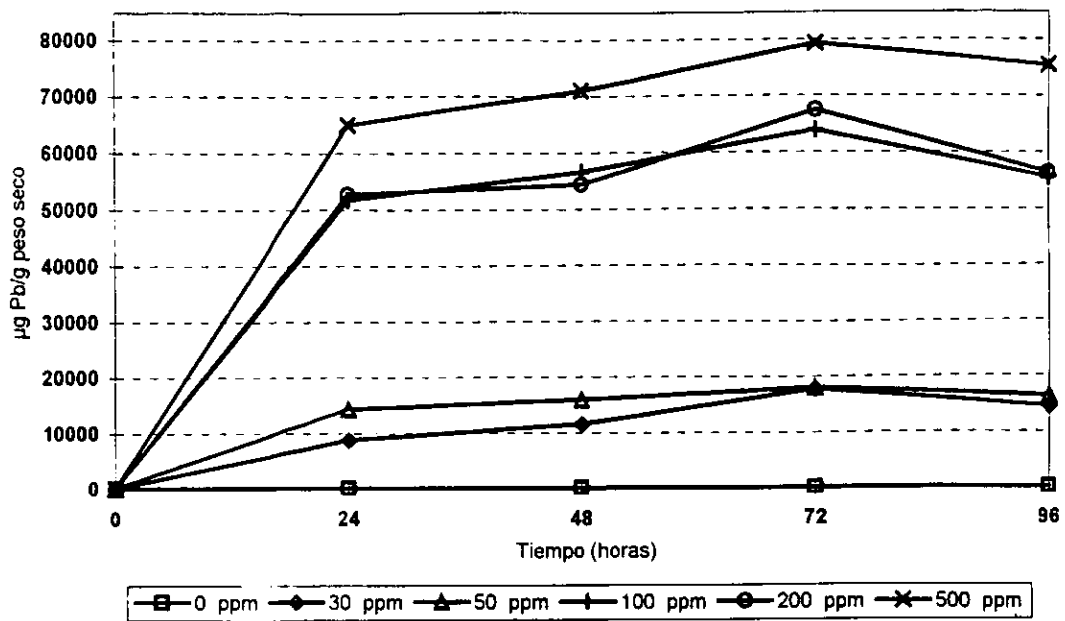


Figura 4.9. Contenido de Pb en *Lemna gibba* L. en luz continua.

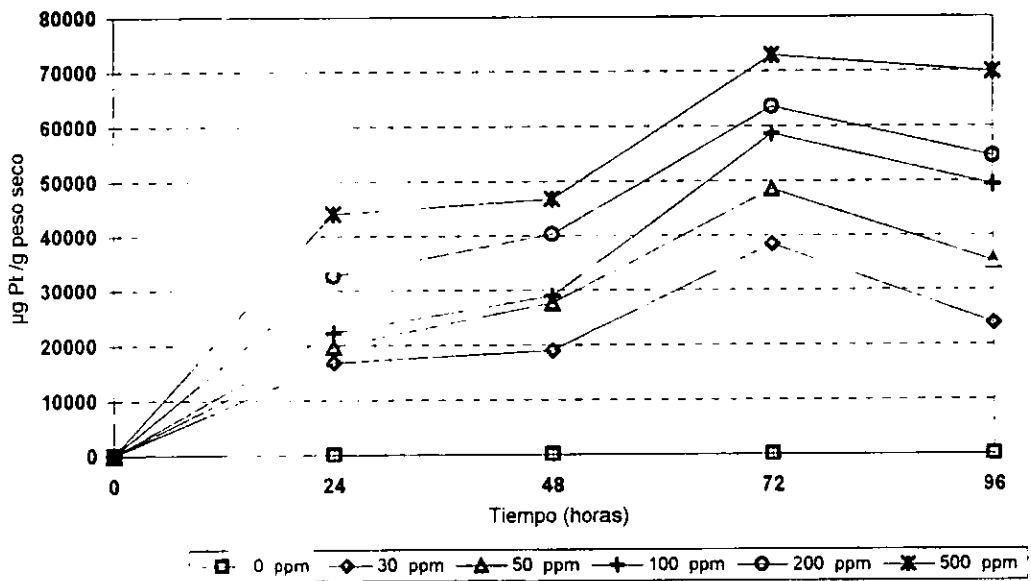


Figura 4.10. Contenido de Pb en *Lemna gibba* L. en luz discontinua.

Los datos de la velocidad de absorción presentaron diferencias significativas entre las dos condiciones de iluminación, siendo más altos los de la luz discontinua (Tabla 4.1).

| <i>Iluminación</i> | <i>Tratamientos</i> | | | | |
|--------------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|
| | <i>Pb (ppm)</i> | | | | |
| | 30 | 50 | 100 | 200 | 500 |
| Continua | 19 | 77 | 254 | 308 | 297 |
| Discontinua | 450 | 603 | 758 | 643 | 602 |

Tabla 4.1. Tasa de absorción de Pb ($\mu\text{g/g}$ peso seco /h) por *Lemna gibba* L. en iluminación continua y discontinua.

Es necesario señalar que los datos del contenido de plomo en el medio nutritivo Hoagland, no se presentaron debido a que hubo precipitación del nitrato de plomo en las soluciones, lo que impidió leer el contenido del metal, después de que las plantas lo absorbieran; este hecho llevó a realizar diluciones del medio nutritivo, que se describen en el experimento 3. Con respecto a los resultados de los contenidos de clorofila **a**, **b** y total, en las dos condiciones de iluminación y los mismos tratamientos con Pb (Figuras 4.11 y 4.12), se encontró que las diferencias en los valores fueron significativas en función de los tratamientos con Pb, y en función de la iluminación continua y discontinua. (tablas 14 y 15 ANOVA).

El análisis de rango múltiple presentó dos grupos homogéneos en luz continua para la clorofila **a**, uno comprende las concentraciones 0, 50, 100 y 200 ppm de Pb, y el otro las de 30 y 50 ppm de Pb. Para la clorofila **b** y la clorofila total, se presentó un sólo grupo

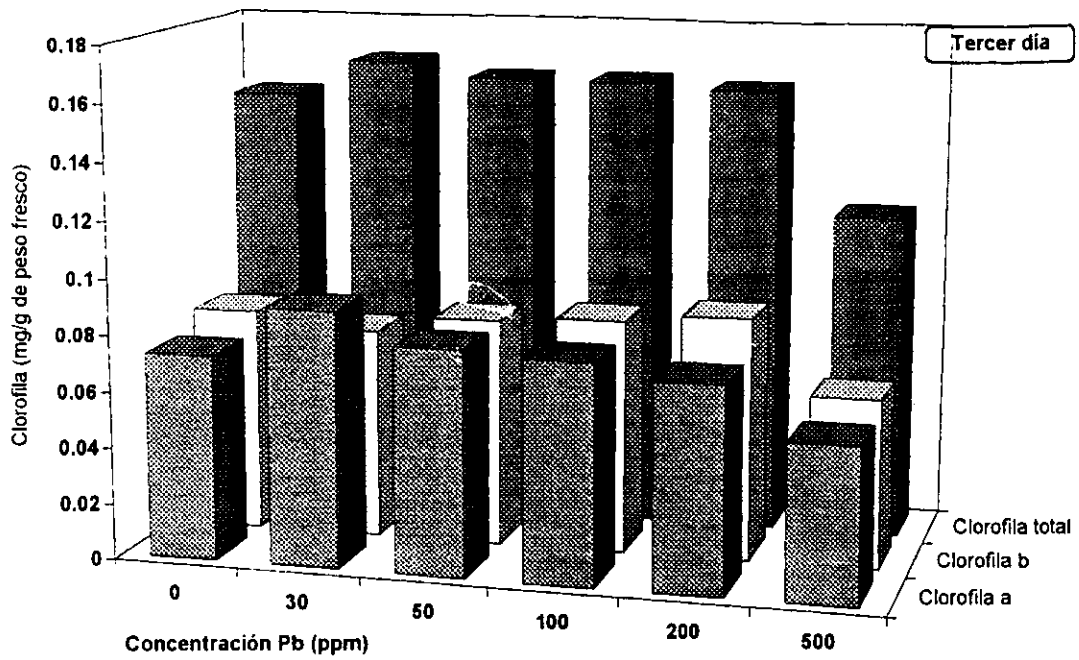


Figura 4.11. Contenido de clorofila de *Lemna gibba* L. en luz continua.

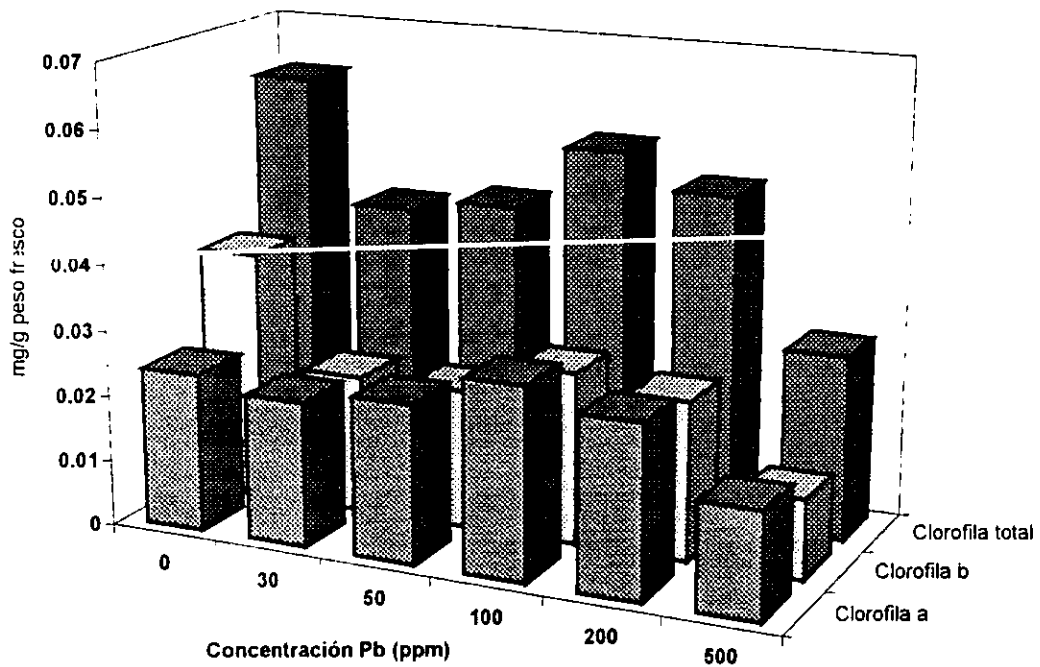


Figura 4.12. Contenido de clorofila de *Lemna gibba* L. en luz discontinua.

homogéneo que incluye 0, 30, 50, 100 y 200 ppm Pb. En condiciones de iluminación discontinua se presentaron tres grupos homogéneos en la clorofila a, que abarcan 0, 30 y 50 ppm de Pb; 0, 50 y 200 ppm Pb y 100 y 200 ppm Pb. En la clorofila b, se presentaron dos grupos homogéneos, uno que comprende 30, 50 y 200 ppm y otro con 100 y 200 ppm Pb. La clorofila total mostró tres grupos homogéneos, uno incluye las concentraciones 30 y 50 ppm Pb, otro con 50 y 200 ppm Pb, y finalmente otro con 100 y 200 ppm Pb.

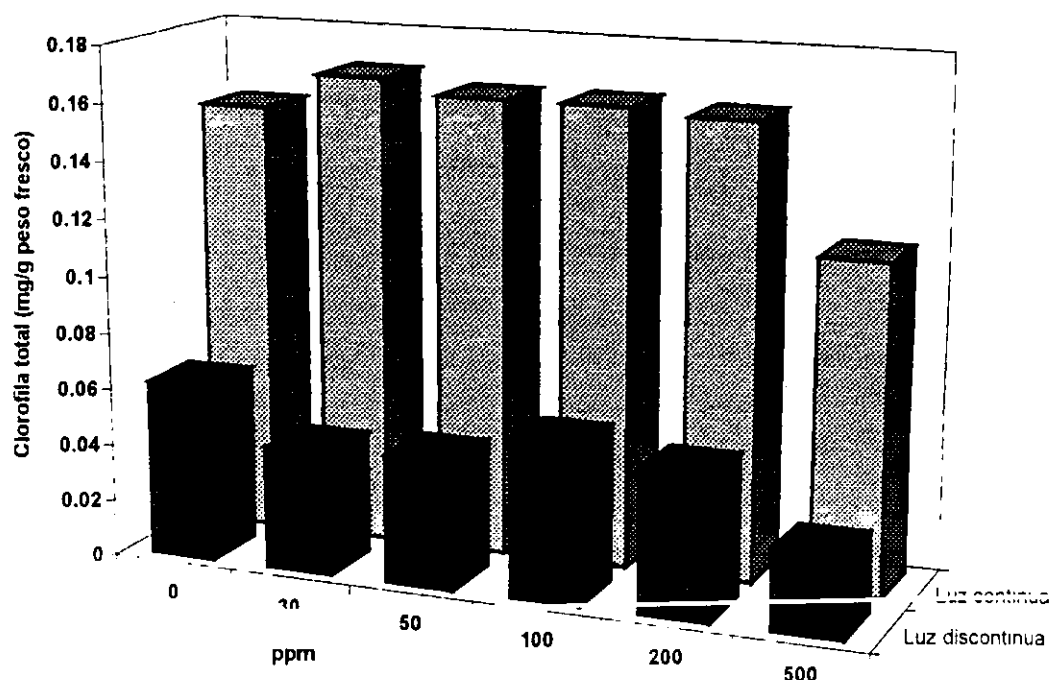


Figura 4.13. Contenido de clorofila total de *Lemna gibba* L. en luz continua y discontinua.

Los valores de clorofila total en las dos diferentes condiciones de iluminación se compararon en la Figura 4.13; como se pudo apreciar, hay un incremento de más del 50% en iluminación continua con relación a la discontinua. El análisis estadístico indicó que las diferencias fueron significativas (tabla 16 ANOVA).

Los resultados del contenido de fenoles totales en *Lemna gibba* L. en las dos condiciones de iluminación (Figura 4.14), señalaron un incremento en todos los lotes del tratamiento con iluminación discontinua; de acuerdo con el análisis estadístico, las diferencias fueron significativas (tabla 17 ANOVA). No se presentaron grupos homogéneos en el análisis de rango múltiple.

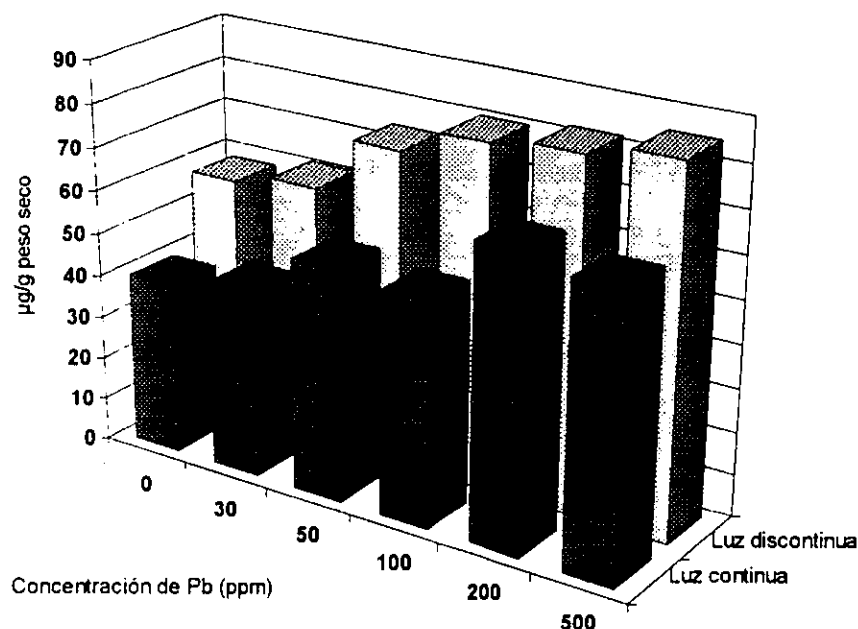


Figura 4.14. Contenido de fenoles totales de *Lemna gibba* L. en luz continua y discontinua.

IV.3. Experimento 3.

En este experimento se tuvieron que ensayar tres diluciones debido a la precipitación del nitrato de plomo en las soluciones nutritivas mencionada; de acuerdo con Bassi, 1993, se hicieron tres diluciones 1:20, 1:40, y 1:50, en las que se midieron las tasas de crecimiento **R** (Figura 4.15) con objeto de encontrar la óptima. Se concluyó que la dilución 1:20 presentó la **R** más alta, sin embargo, todavía se dio la precipitación del nitrato de plomo, por lo que se eligió la dilución 1:40.

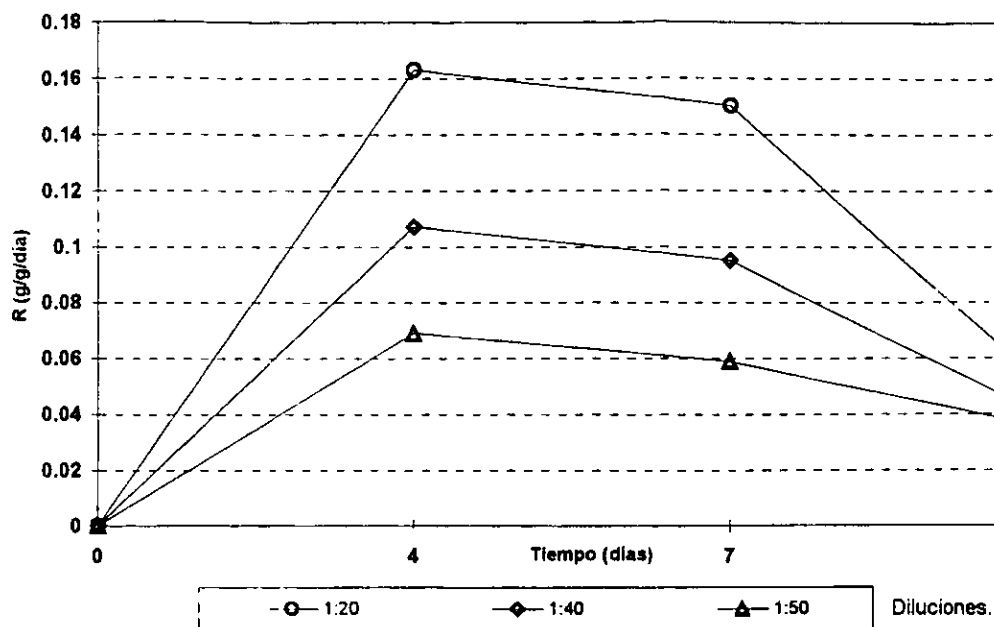


Figura 4.15. Tasa de crecimiento (R) de *Lemna gibba* L. con diferentes diluciones de medio Hoagland.

IV.4. Experimento 4.

En la tabla 4.2 se presentan los resultados de los componentes bioquímicos que medidos en este experimento; los fenoles totales tuvieron una relación directamente proporcional con los tratamientos de plomo en el medio nutritivo, hasta llegar a un aumento del 22% en el tratamiento 500 ppm Pb con relación al testigo sin Pb; estos

| Tratamiento con Pb (mg/L) | Fenoles totales | Almidón soluble total | Azúcares libres totales | Proteínas solubles totales | Aminoácido libres totales |
|---------------------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Testigo sin Pb | 44±.45 | 35±2.2 | 48±.41 | 28.5±.60 | 11.3±.15 |
| 50 | 46±.81 | 16±.75 | 53±.26 | 11.4±.35 | 11.7±.17 |
| 100 | 47±.52 | 15.6±.95 | 57±.30 | 5.8±.20 | 15±.47 |
| 200 | 50±.37 | 14.8±1.2 | 59±.45 | 3.2±.36 | 18±.26 |
| 300 | 52±.25 | 14.3±1.3 | 72±1.0 | 1.5±.4 | 39.1±.37 |
| 500 | 54±.26 | 7±.36 | 68±.70 | 1.3±.26 | 31.8±.36 |

Los resultados son la media ± desviación estándar.

Tabla 4.2. Componentes bioquímicos de *Lemna gibba* tratada con Pb.

resultados fueron significativos (tabla 18 ANOVA); además, el análisis de rango múltiple indicó la presencia de tres grupos homogéneos, uno que incluye 0, 50 y 100 ppm, otro con 50, 100 y 200 ppm Pb; y otro de 200, 300 y 500 ppm Pb. El almidón soluble total por su parte, tuvo una relación inversamente proporcional con los tratamientos de Pb, disminuyendo hasta un 80% en el lote 500 ppm Pb en relación al testigo; la tabla 19 de ANOVA indicó que los resultados fueron significativos; el análisis de rango múltiple, sólo presentó un solo grupo homogéneo con las concentraciones 50, 100 200 y 300 ppm de Pb. El contenido de azúcares libres totales aumentó en relación directa a la concentración del plomo en el medio nutritivo hasta alcanzar un 41.6% en el lote 500 ppm Pb, por sobre el testigo. La tabla 20 ANOVA indicó que los resultados fueron significativos; el análisis de rango múltiple, sólo mostró un grupo homogéneo que incluye 100 y 200 ppm Pb. Las proteínas solubles totales de *Lemna gibba* señalaron una relación inversamente proporcional a los tratamientos con Pb, disminuyendo hasta un 95% en el lote 500 ppm Pb en relación al testigo; la tabla 21 ANOVA indicó que los resultados fueron significativos, el análisis de rango múltiple presentó un solo grupo homogéneo que incluye 300 y 500 ppm de Pb. Finalmente, los aminoácidos libres totales aumentaron también en proporción directa al plomo en forma análoga a los azúcares libres totales, aumentando hasta un 174% en el lote 500 ppm Pb en relación al testigo sin Pb. La Tabla 22 de ANOVA encontró significativos los resultados, el análisis de rango múltiple presentó un solo grupo homogéneo que incluye a las concentraciones de 0 y 50 ppm de Pb.

Los resultados de la tasa de crecimiento R de *Lemna gibba* en el medio nutritivo diluido 1:40 en condiciones de luz discontinua (Figura 4.16), fueron significativos tanto en función de los tratamientos con Pb, como en función del tiempo (tabla 23 ANOVA). El análisis de rango

múltiple presentó dos grupos homogéneos, uno que incluye los tratamientos 300 y 500 ppm de Pb, y el otro con 100, 200 y 300 ppm de Pb. No hubo grupos homogéneos con respecto al tiempo.

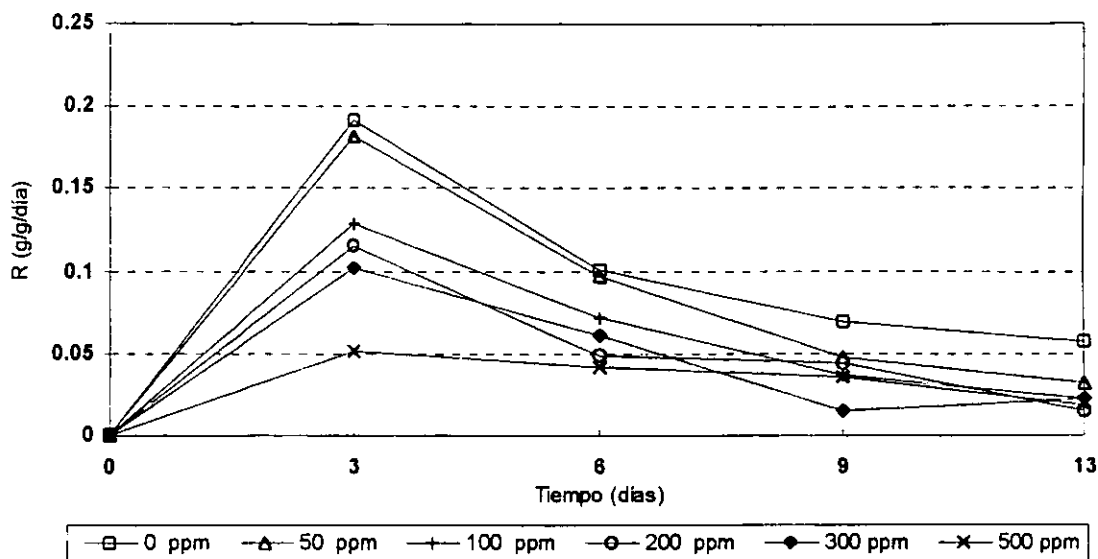


Figura 4.16. Tasa de crecimiento (R) de *Lemna gibba* L. en medio Hoagland diluido 1:40 en luz discontinua.

El contenido de clorofilas en *Lemna gibba* creciendo en el medio nutritivo diluido 1:40 (Figura 4.17) denotó diferencias significativas (tabla 24 ANOVA). El análisis de rango múltiple mostró que para la clorofila **a** se presentó un grupo homogéneo que incluye todos los tratamientos con Pb y excluye el testigo; para la clorofila **b** se presentaron tres grupos homogéneos, uno incluye a 50, 100 y 500 ppm; otro con 100, 200 y 500 ppm y uno más con 100, 200 y 300 ppm de Pb. La clorofila total mostró dos grupos homogéneos, uno con 50, 100, 200 y 500 ppm, y otro que incluyó a 100, 200 y 300 ppm de Pb.

Los resultados de la concentración de Pb en *Lemna gibba* medido durante siete días (Figura 4.18), señaló un incremento notable hacia el tercer día; fueron significativos en función al tiempo y a los tratamientos con Pb (Tabla 25 ANOVA); por su

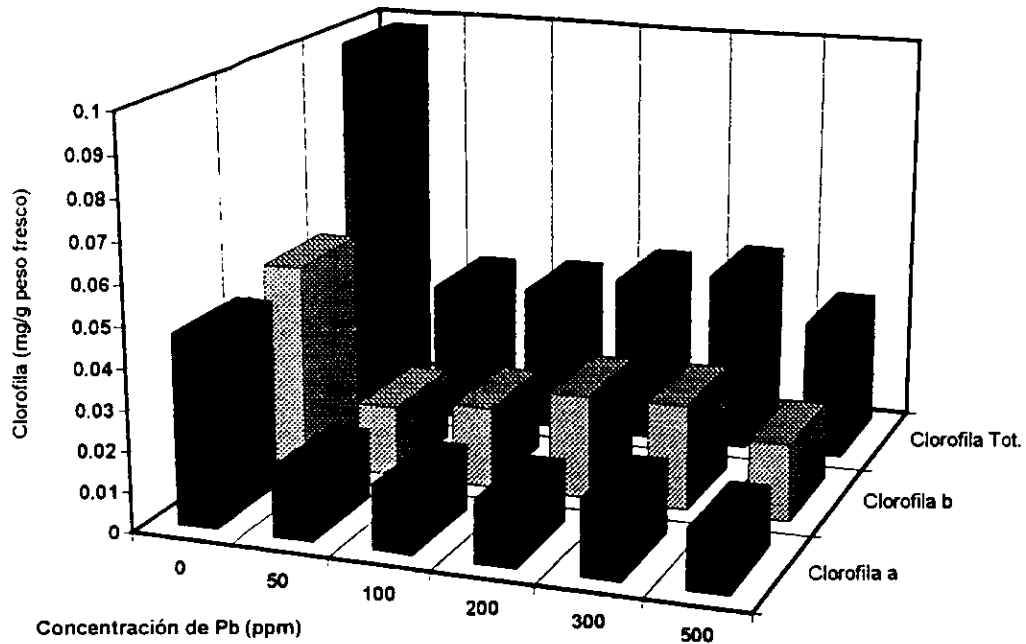


Figura 4.17. Contenido de clorofilas en *Lemna gibba* L. en medio Hoagland diluido 1:40 en luz discontinua.

parte, el análisis de rango múltiple señaló dos grupos homogéneos, uno incluye los tratamientos 100, 200 y 500 ppm Pb y otro que comprende los tratamientos 200, 300 y 500 ppm de Pb. Con respecto al tiempo, se presentaron tres grupos homogéneos, uno incluye los días 1, 4 y 5; otro con los días 4, 5 y 2, y otro con los días 7 y 6.

Los resultados del contenido de Pb en el medio nutritivo diluido, después de haber estado con la *Lemna gibba* durante siete días (Figura 4.19) fueron significativos, tanto en función de los tratamientos con Pb, como en función del tiempo (tabla 26 ANOVA). El análisis de rango múltiple no señaló grupos homogéneos con relación a los tratamientos con Pb, aunque indicó tres grupos homogéneos con relación al tiempo, uno con los días 2, 3 y 4, el segundo con los días 4, 5 y 6 y el tercero los días 5, 6 y 7.

El análisis de regresión simple reveló que no hay correlación entre el Pb contenido en la *Lemna gibba* y el medio nutritivo, ni en los valores de almidón y azúcares libres, ni de los

de proteínas y aminoácidos libres.

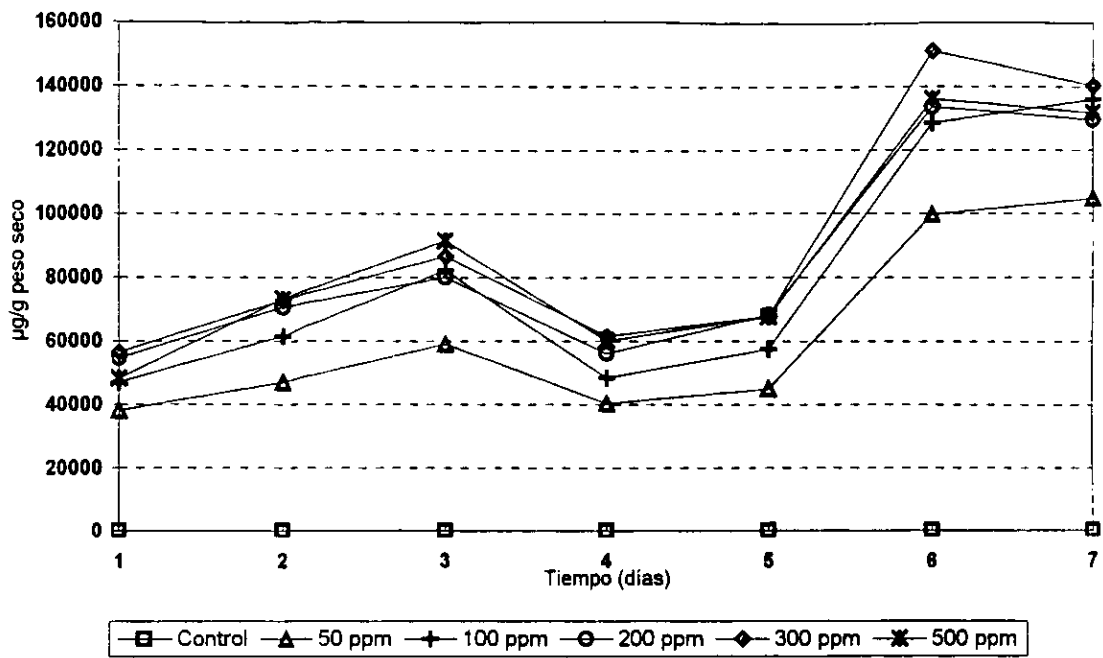


Figura 4.18. Concentración de Pb en *Lemna gibba* L. en medio Hoagland diluido 1:40 en luz discontinua.

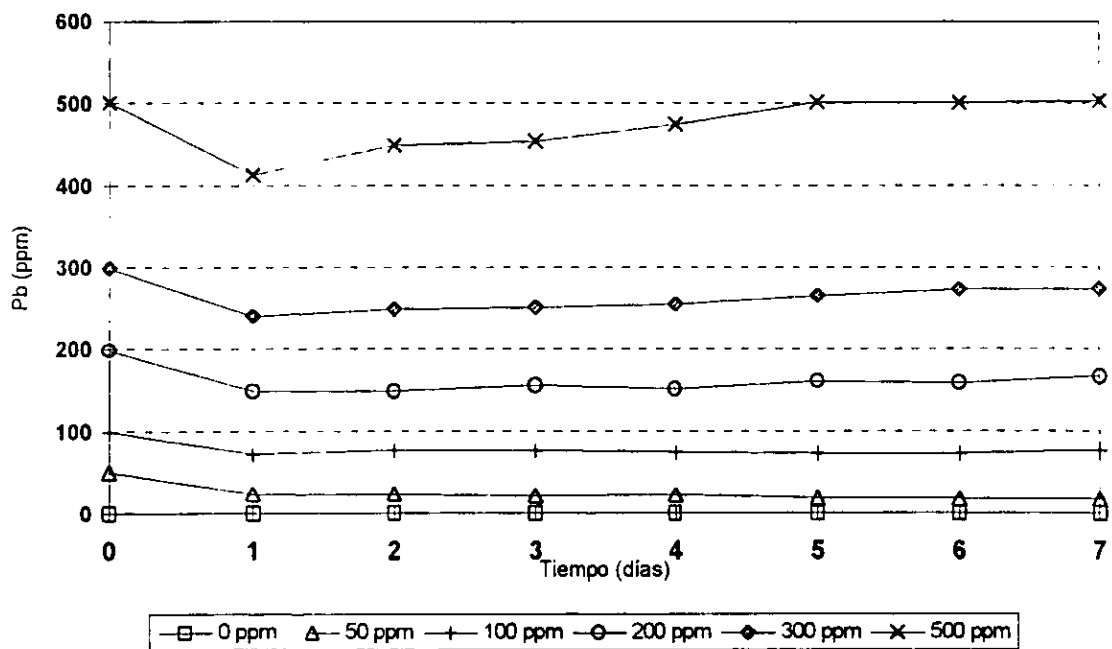


Figura 4.19. Contenido de Pb en medio Hoagland diluido 1:40 después de estar con la *Lemna gibba* L. en luz discontinua.

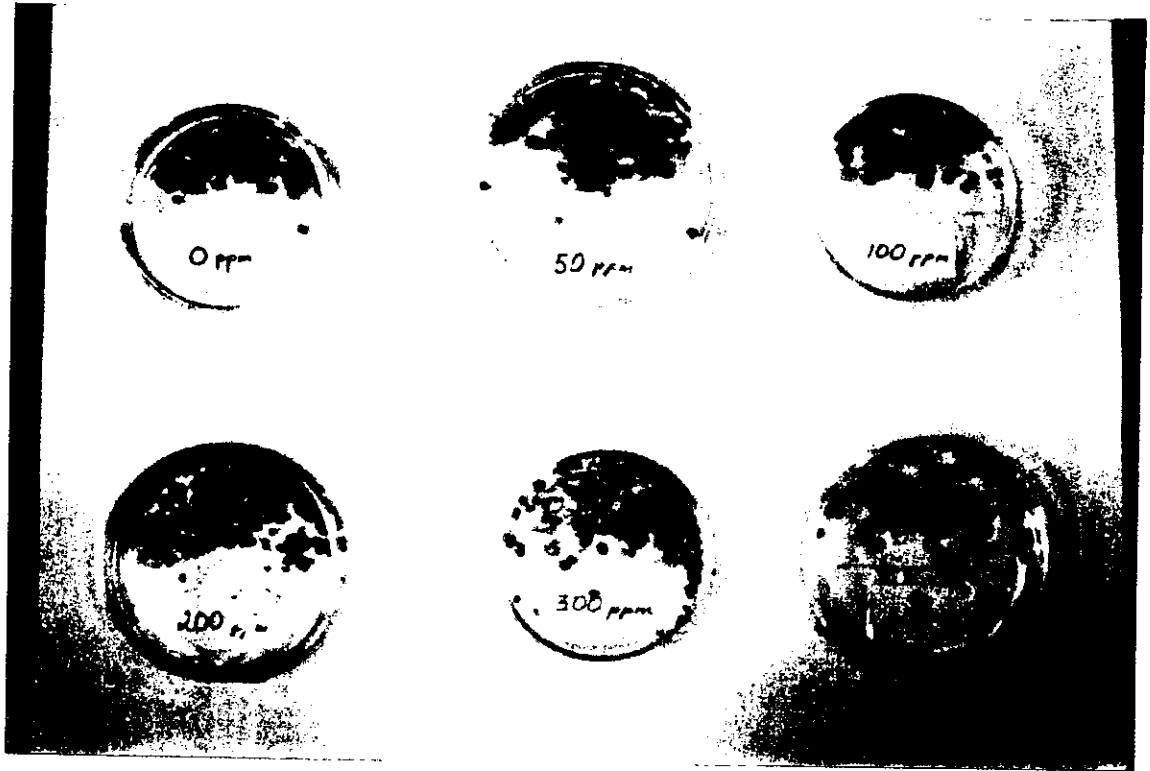
IV.6. Estudio histoquímico

Los resultados revelaron concordancia con los resultados de los parámetros bioquímicos, debido a que en las tinciones para proteínas y almidón se presenta una relación inversa al aumento de plomo en el medio, mientras que en la tinción para fenoles hay un aumento proporcional en función del Pb en el medio. Los cortes se fotografiaron a diferentes aumentos buscando en donde se observaran mejor las tinciones y no en todos los tratamientos coincidieron las mejores observaciones con el mismo aumento. En la figura 4.21, tenemos a las proteínas teñidas de color rojo, encontrando como las proteínas se acumularon en los cloroplastos, notando disminución de la coloración roja en el tratamiento de 200 ppm d) hasta llegar al tratamiento 500 ppm Pb f) en donde ya los cloroplastos se observaron transparentes.

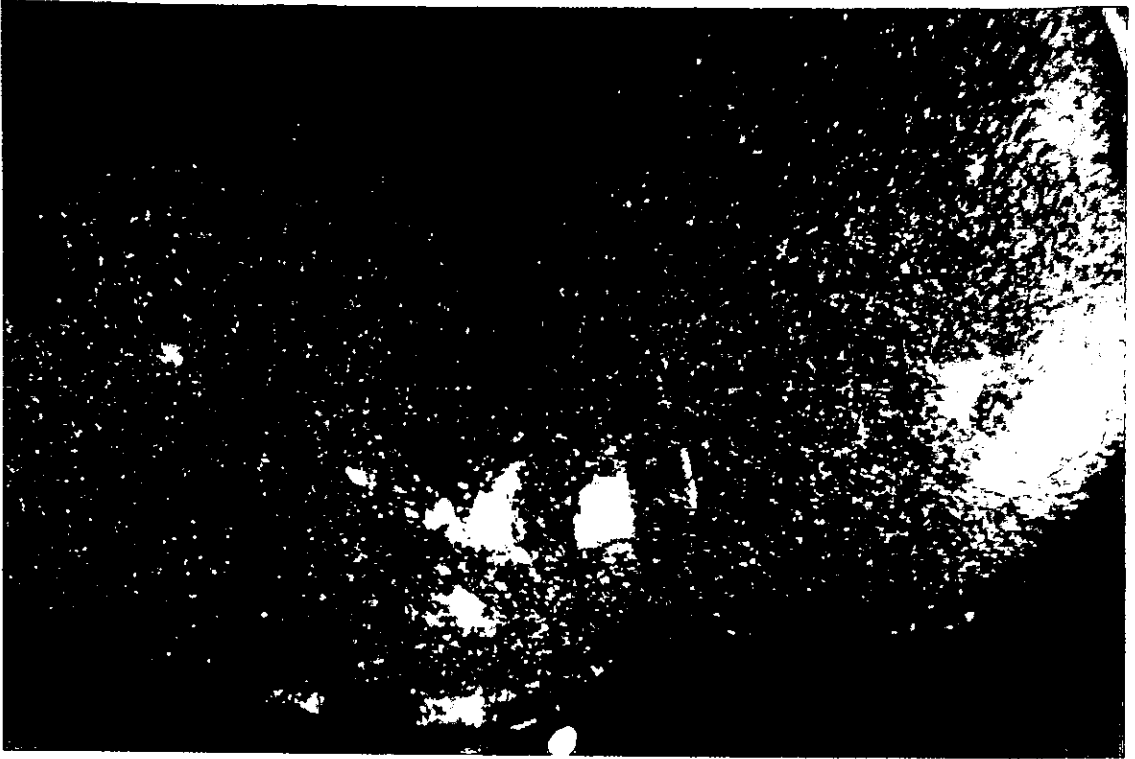
El almidón (Figura 4.22) presentó una coloración morada muy extendida en las células parenquimáticas de las frondas de *Lemna gibba* asociada a los cloroplastos, también esta técnica mostró disminución del color morado hasta el tratamiento de 200 ppm de Pb d), llegando a la transparencia de los cloroplastos en 500 ppm de Pb.

Los fenoles (Figura 4.23) fueron haciéndose evidentes por medio de la aparición de una coloración amarilla b), c), d), e), que se acentúa hasta convertirse en una tonalidad pardosa en el tratamiento 500 ppm f).

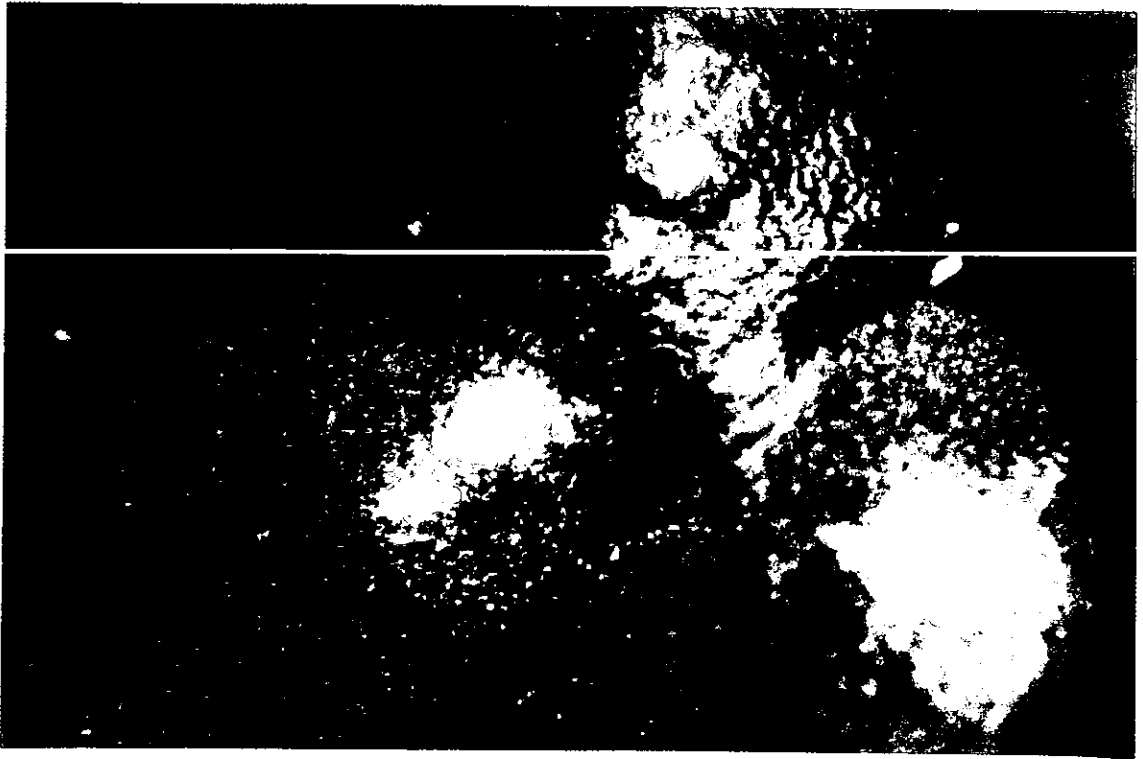
Figura 4.20. Efectos de clorosis en las frondas de *Lemna gibba* ocasionados por Pb; (a) vista general de todos los tratamientos; (b) testigo sin Pb; (c) 50 ppm; (d) 100 ppm; (e) 200 ppm; (f) 300 ppm; (g) 500 ppm de Pb, 40 X.



(2)



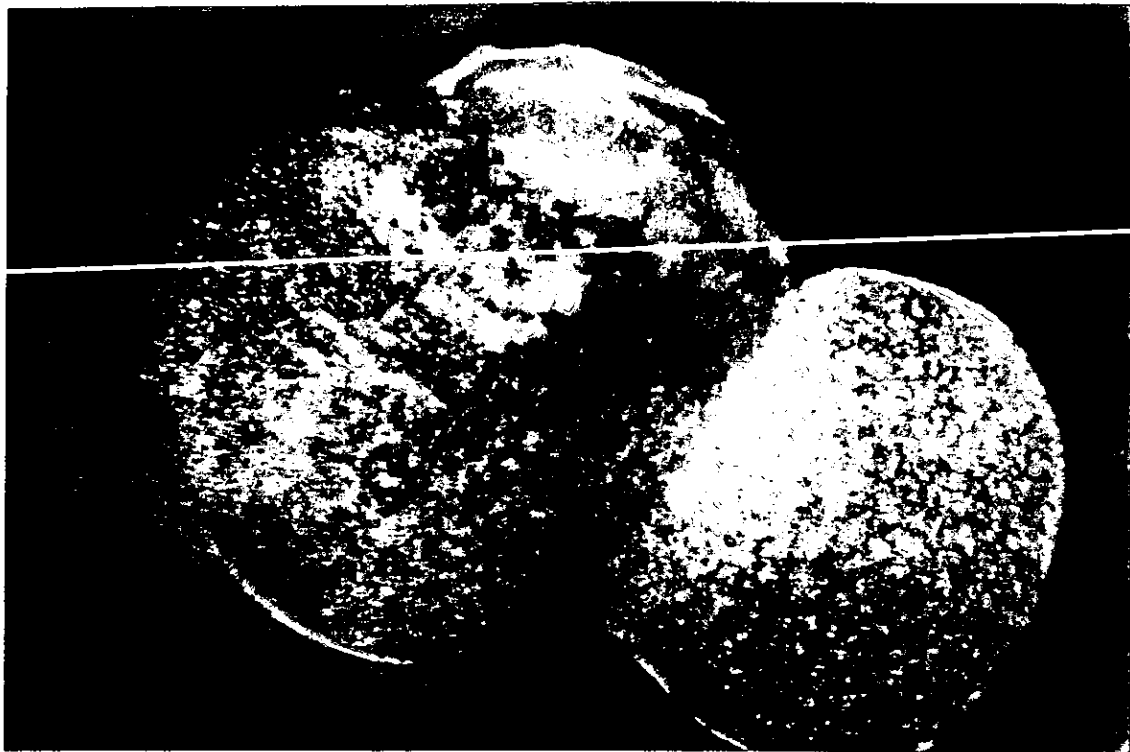
(b)



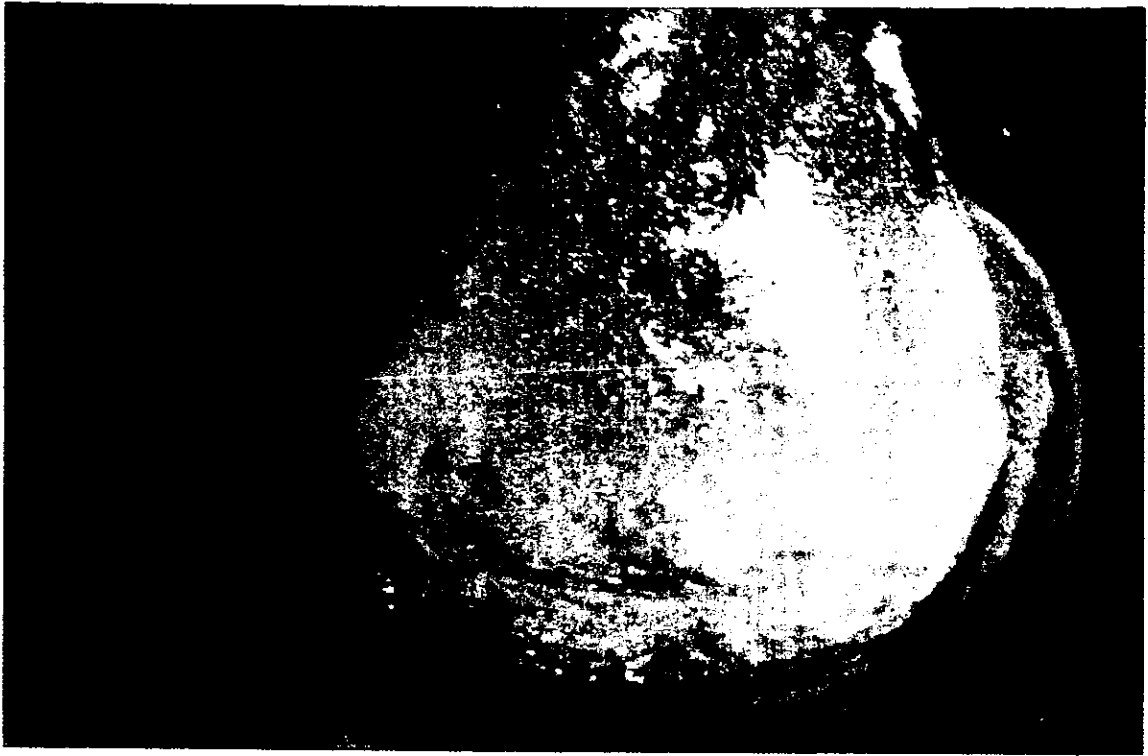
(c)



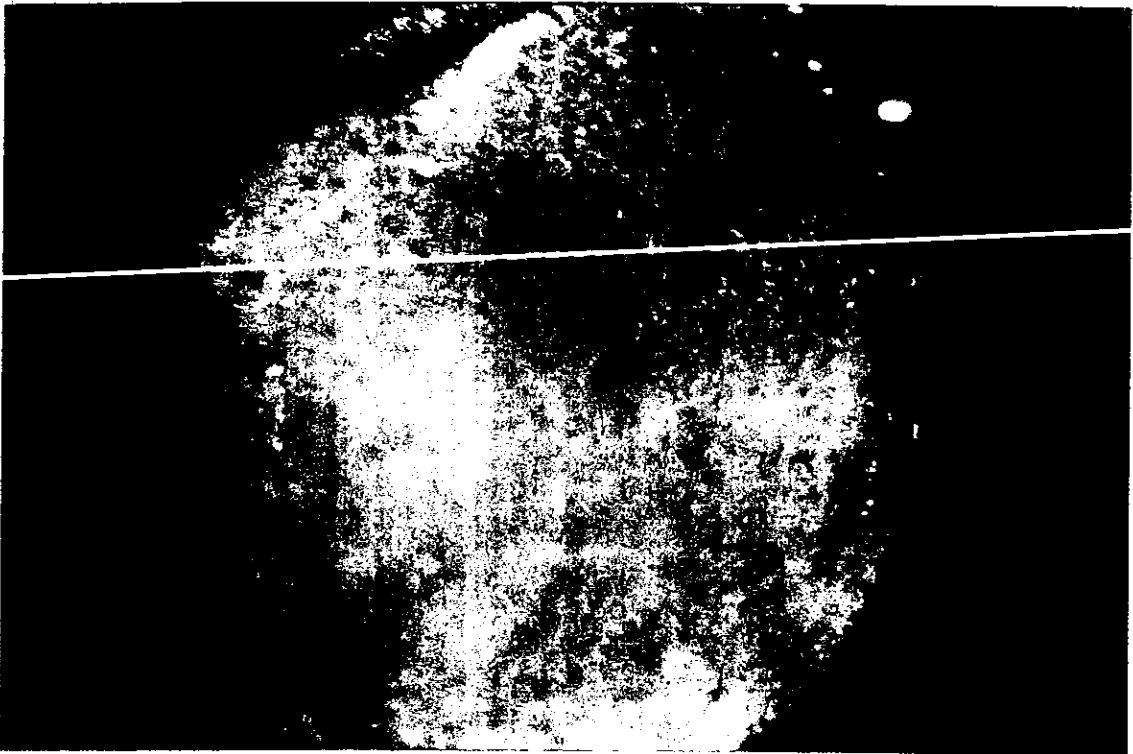
(d)



(e)

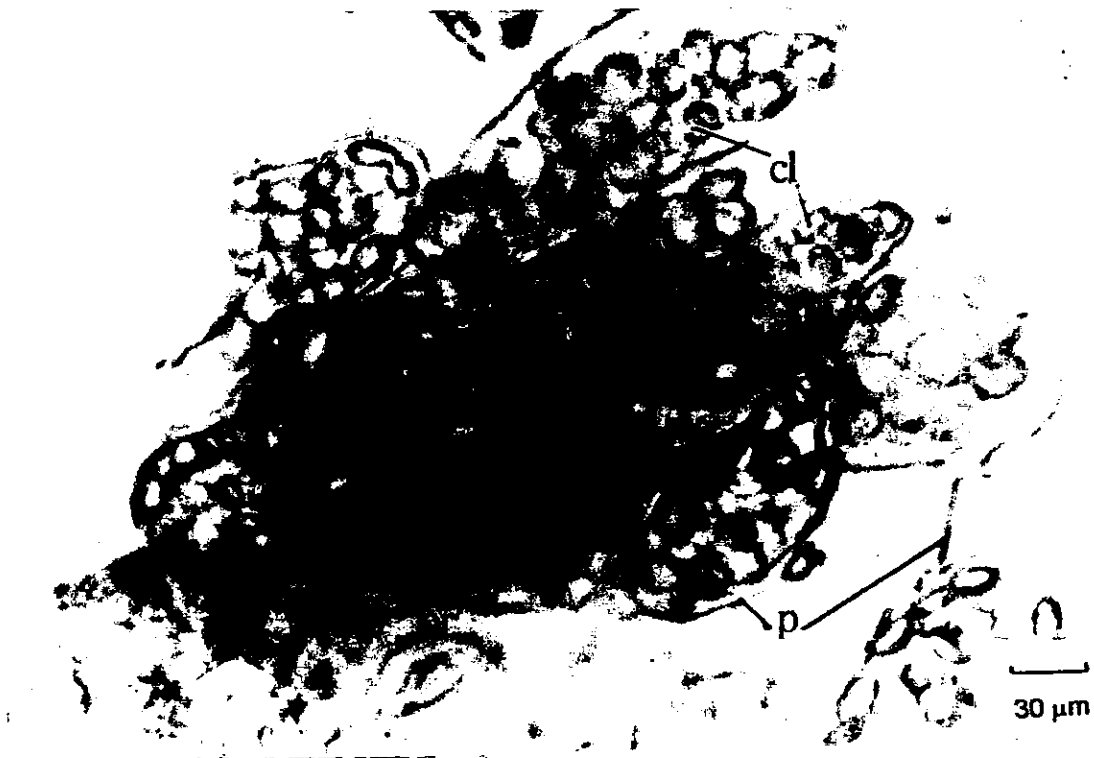


(f)

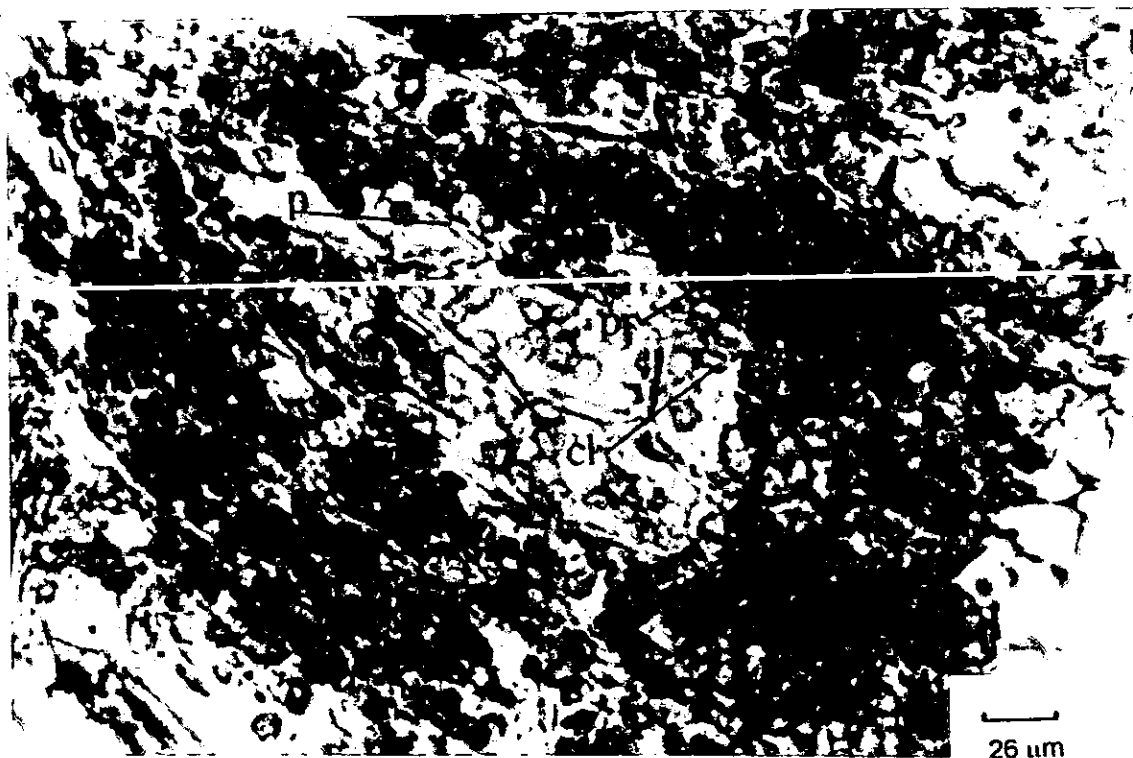


(g)

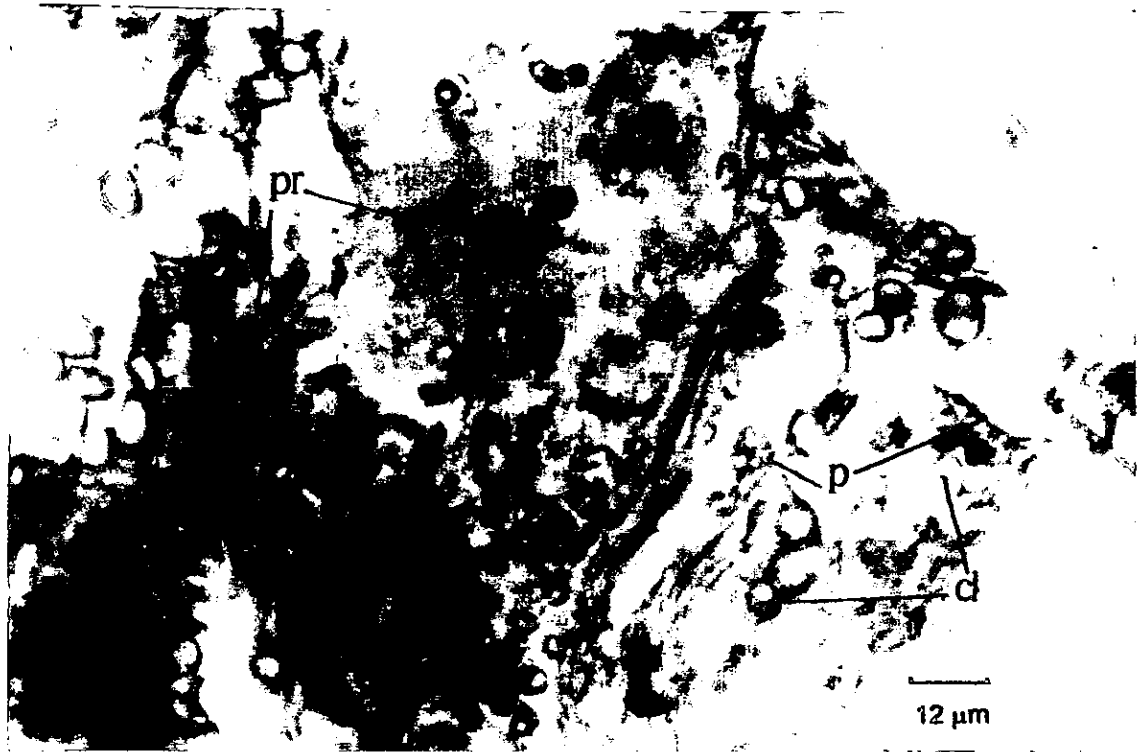
Figura 4.21. Corte transversal de la fronda de *Lemna gibba* con la tinción de eosina para proteínas (a) testigo sin Pb, 200X, (b) 50 ppm Pb, 161X, (c) 100 ppm Pb, 201X, (d) 200 ppm Pb, 315X, (e) 300 ppm Pb, 252X, (f) 500 ppm Pb.161X, (p - pared celular; cl - cloroplasto; pr - proteínas).



(a)



(b)



(c)



(d)

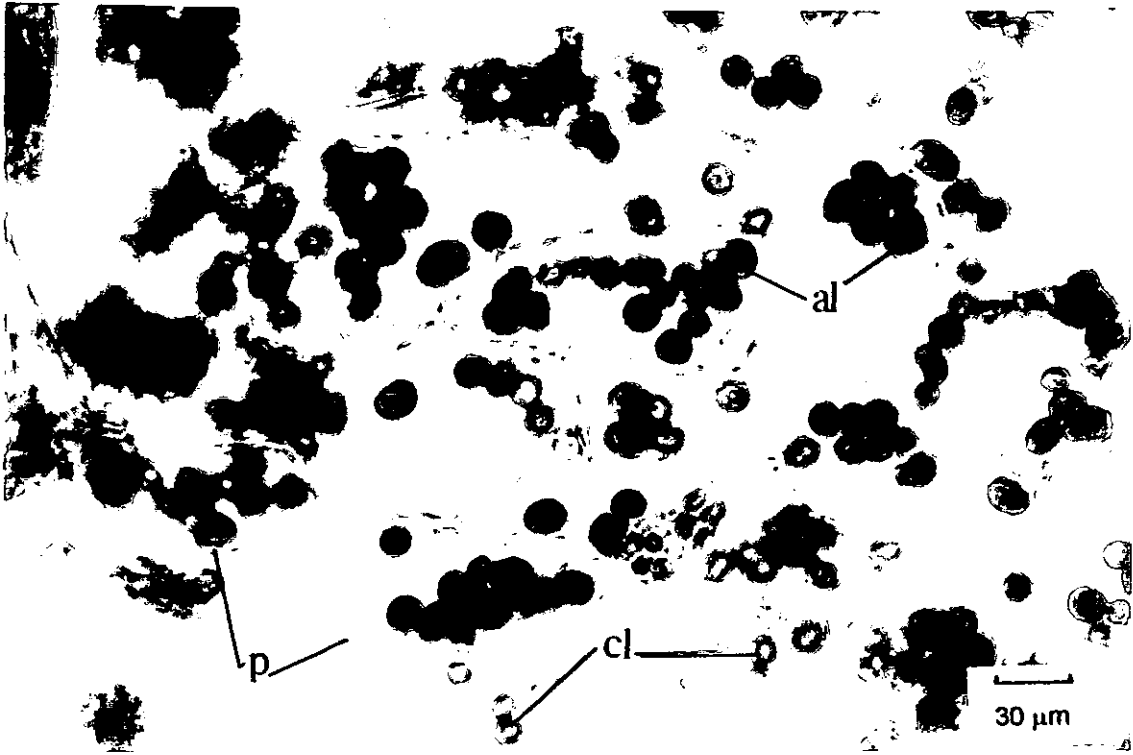


(e)

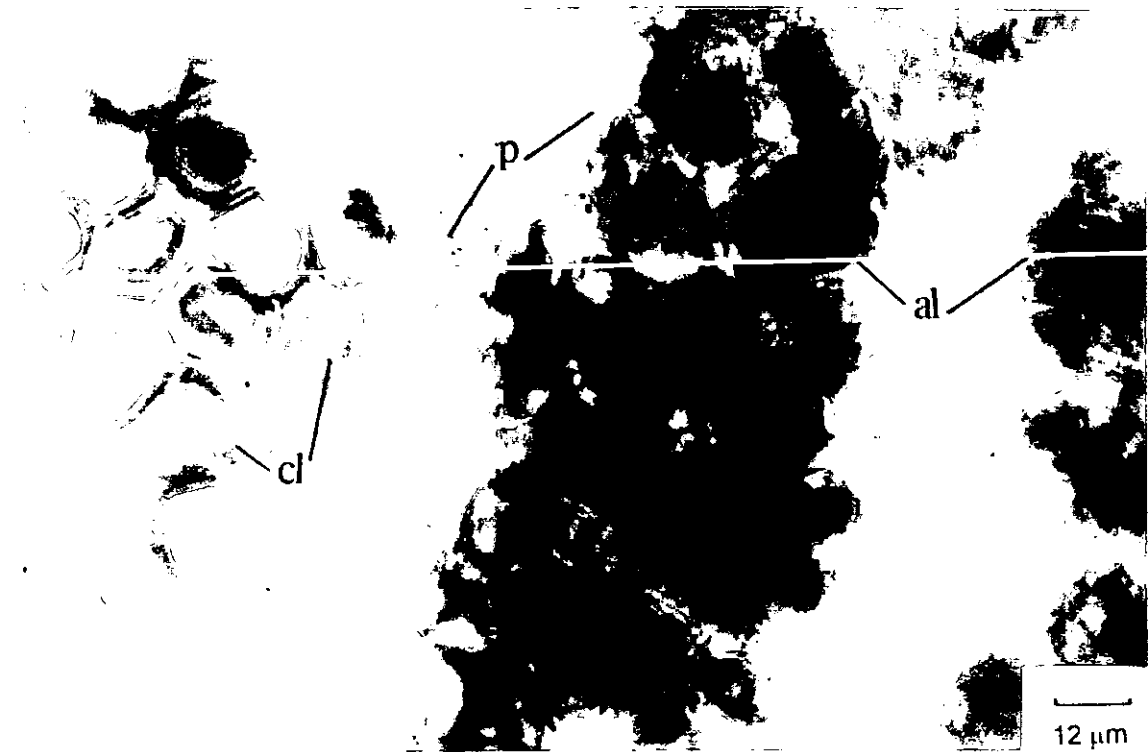


(f)

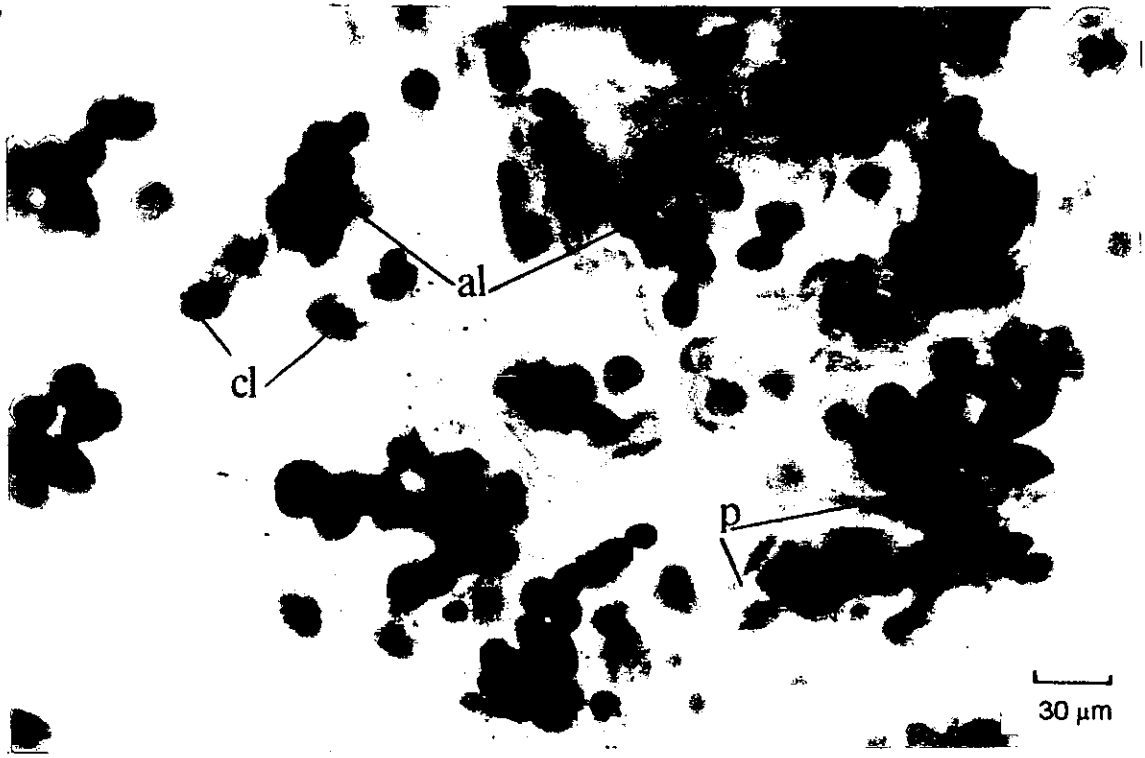
Figura 4.22. Corte transversal de la fronda de *Lemna gibba* con la tinción de lugol para almidón (a) testigo sin Pb, 126X, (b) 50 ppm Pb, 405X, (c) 100 ppm Pb, 201X, (d) 200 ppm Pb, 102X, (e) 300 ppm Pb, 102X, (f) 500 ppm Pb, 161X, (p - pared celular; cl - cloroplasto; al - almidón).



(a)



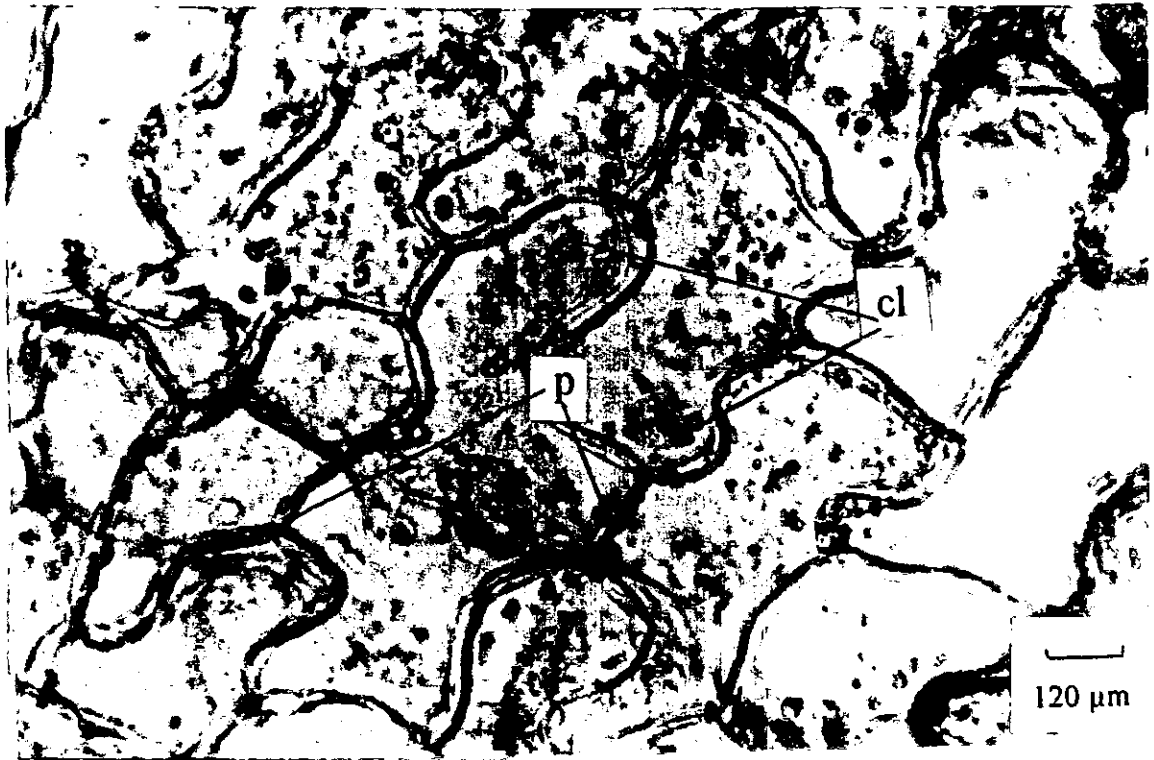
(b)



(c)



(d)

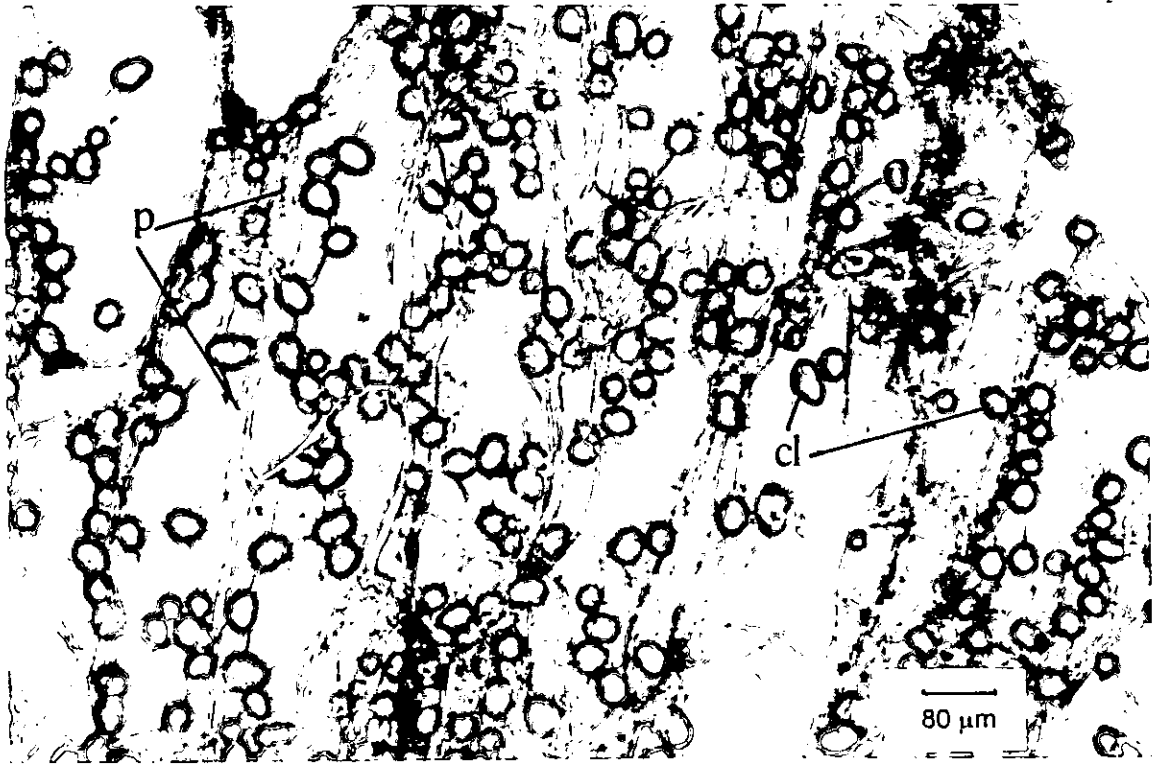


(e)

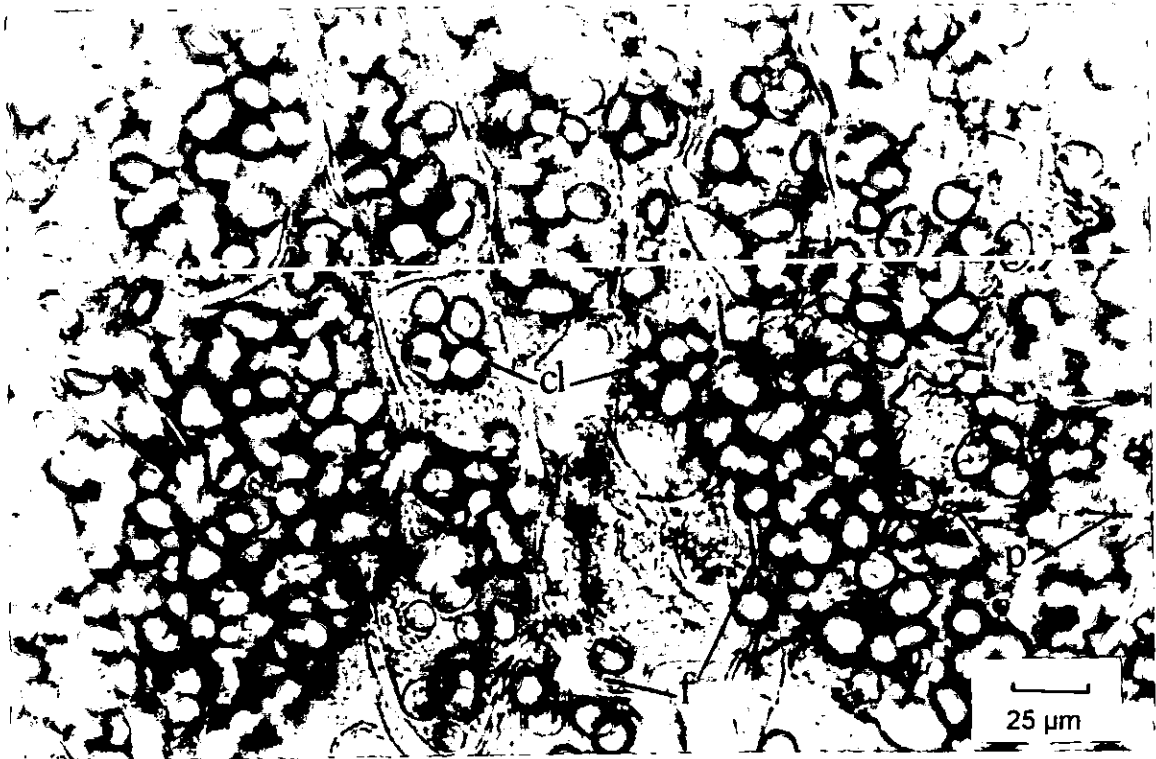


(f)

Figura 4.23. Corte transversal de la fronda de *Lemna gibba* con la tinción de ácido sulfanílico para fenoles, (a) testigo sin Pb, 128X, (b) 50 ppm Pb, 160X, (c) 100 ppm Pb, 315X, (d) 200 ppm Pb, 161X, (e) 300 ppm Pb, 161X, (f) 500 ppm Pb, 160X, (p - pared celular; cl - cloroplasto; f - fenoles).

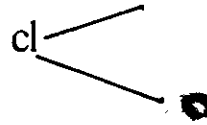


(a)



(b)

cl



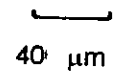
p



f



40 μm



(e)

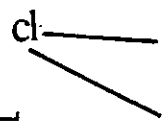
f



D



cl



43 μm



(f)



(c)



(d)

V. DISCUSIÓN

La contaminación del agua existe desde el momento que hay actividad humana sobre todo en lugares de concentraciones de población. Desde los siglos XIII y XV y sobre todo a partir de la expansión industrial y urbana del siglo XIX, las relaciones entre el hombre y su medio se encuentran totalmente alteradas.

Las aguas continentales presentan contaminación desde diversas fuentes, como son la lluvia y la nieve que al caer acarrear contaminantes atmosféricos, por lo que al llegar a la tierra, contienen material extraño de diferentes orígenes, tales como partículas de polvo, bióxido de carbono, microorganismos y polen, así como trazas de contaminantes industriales, como anhídrido sulfuroso, ácido sulfúrico, óxidos de nitrógeno, plaguicidas y ciertos metales. Mientras el agua se escurre por el suelo y se filtra en la tierra, su carga de impurezas aumenta continuamente; una parte de estas sustancias son llevadas al mar, donde se acumulan. Sin embargo, la concentración de materia disuelta en los océanos aumenta muy lentamente, porque el volumen de éstos es muy grande (Nriagu, 1974).

El hombre puede subsistir con 1.5 litros de agua diarios; sin embargo, teniendo en cuenta los aspectos de higiene personal y doméstica, se calcula una media de 40-50 litros de agua consumidos por persona/día. A ello hay que sumar las necesidades de agua en la agricultura y ganadería, lo que supone en ciertos países y regiones un consumo de hasta 500 litros diarios por habitante.

Estas cifras reflejan hacia un futuro un grave problema para los seres vivos, pues las reservas de agua dulce en el planeta se calculan en aproximadamente 24 millones de Km y la contaminación disminuye día a día la calidad de muchas aguas y por consiguiente la posibilidad de su utilización.

El poder de biodegradación de las aguas es grande, pero si la concentración de sustancias orgánicas y químicas supera ciertos límites, las aguas no pueden regenerarse por la acción de las bacterias. La vida desaparece y los ríos y lagos se convierten en cloacas abiertas. El problema de la contaminación de las aguas no afecta solamente al hombre y a los animales acuáticos, sino que constituye una preocupación cada día mayor para las propias industrias, que se ven obligadas a utilizar aguas contaminadas, incompatibles con ciertos tipos de procesos industriales (Rohatgi y Chen, 1975).

Entre los agentes contaminantes del agua destacan los metales tóxicos entre los cuales esta el plomo; el uso inapropiado de este metal ha producido envenenamiento desde la antigüedad, la enfermedad llamada saturnismo (del nombre asignado al plomo por los alquimistas), fue descrita por primera vez por Nicandro hace unos 2,000 años. Actualmente el plomo se encuentra en el aire, el agua de consumo y el suelo como resultado de una variedad de actividades humanas; se le encuentra prácticamente en todos los alimentos sobre todo en los enlatados; los vegetales de hortaliza contienen menor proporción. Los compuestos del plomo se utilizan en la fabricación de pinturas, plásticos, baterías, el vidriado de la loza y en algunos procesos de tratamiento derivados del petróleo, una parte de este plomo llega al medio ambiente (Lee, 1972).

La reducción de la contaminación del agua o mejor dicho, la administración de la calidad del agua, tiene aspectos sociales, económicos, políticos y técnicos. Por consiguiente, resulta necesario enfocar este tema como un sistema complejo social y técnico, que requiere de diversas disciplinas para definir los problemas con toda exactitud y aplicar las medidas de corrección más efectivas.

A pesar de la preocupación por la contaminación por plomo de las aguas naturales y de sus efectos nocivos sobre los organismos, se tiene poca información acerca de la forma en que se encuentra este metal en las soluciones acuosas naturales. Aparentemente, procesos como la precipitación y la quelación, alteran la concentración del plomo disuelto en las aguas superficiales (Nriagu, 1974).

Estudios realizados sobre el efecto de descargar suspensiones que contenían plomo en el mar, encontraron que el metal era liberado después de una mezcla inicial, seguida de una disminución gradual en la cantidad de plomo soluble, esto se realizó en cerca de dos semanas. La liberación del plomo soluble se atribuyó a la oxidación de precipitados portadores del metal, a la oxidación de sulfuros, la dilución de metales traza, la formación de complejos con ligandos inorgánicos, especialmente cloruros y con orgánicos provenientes de desperdicios.

Sin embargo, la capacidad de los lagos, estanques y otras reservas de agua, para asimilar el plomo de las descargas de desperdicios industriales es más limitada; la carga de plomo en estos ecosistemas se ha vuelto biológicamente nociva (Rothagi y Chen, 1975).

En los sedimentos anaeróbicos, la mayor parte del plomo disuelto, se inmoviliza en forma de sulfuro (PbS). Aún cuando la alquilación anaeróbica del plomo es posible, algunos de estos compuestos pueden provenir del rompimiento bioquímico de otras moléculas tales como las proteínas. La fuga de los alquilos de plomo y de otros compuestos orgánicos derivados de este metal, es una de las vías de re-entrada del plomo en el compartimento de las partículas de las capas superiores del agua. En los sedimentos deficientes en sulfuros en los que no hay suficientes iones para precipitar el plomo, también se liberará plomo inorgánico disuelto.

El almacén de partículas de plomo sufre muy pocos cambios al penetrar en los sedimentos anaeróbicos. La degradación del material orgánico podría liberar algo de plomo que sería recogido por los hidróxidos. Hay pues la tendencia de un flujo unidireccional de plomo hacia los sedimentos anaeróbicos (Natush y Evans, 1974).

Los resultados de este estudio mostraron la resistencia de *Lemna gibba* al Pb. Según datos bibliográficos (Jain 1988), en concentraciones de 4 a 8 ppm, el Pb se vuelve tóxico para las plantas acuáticas. Sin embargo, con base en tales concentraciones se encontró que las mismas no fueron tóxicas para *Lemna gibba*, y que la tasa de crecimiento se eleva a medida que aumenta la concentración de Pb en el medio, por el incremento del nitrógeno en el mismo proveniente del nitrato de plomo, usado como sal dosificante.

Los resultados de los contenidos de clorofilas **a**, **b** y total determinadas al tercer día del experimento permiten comprobar que con las concentraciones de Pb de 2, 4 y 6 ppm

fueron inferiores al testigo; sin embargo, en el tratamiento con 8 ppm de Pb, aumentan sus valores igualando los del testigo. A los 26 días de iniciada la experimentación, los tratamientos 2, 4 y 6 ppm de Pb superaron los valores del testigo; estos resultados no concuerdan con la hipótesis planteada, en la que se esperaba que el Pb afectara de igual forma en el tiempo a la concentración de clorofila de *Lemna gibba*, tampoco concuerdan con los correspondientes a la literatura, donde se encontró que la fotosíntesis, y con ella la cantidad de clorofilas, aumenta en función de la saturación de la intensidad de la luz (Wedge y Burris 1982; Oëgren y Oëquist, 1984_a; Diril e Inel 1994).

Con respecto a los fenoles totales no se observó una relación directamente proporcional tan evidente como en el caso de las clorofilas al tercer día del experimento, en razón de que probablemente las concentraciones no fueron lo suficientemente tóxicas para que *Lemna gibba* se estimulara a sintetizarlos en mayor cantidad. Como se conoce, estas sustancias vegetales secundarias se presentan como respuesta al estrés que padecen las plantas.

A pesar de que *Lemna gibba*, ya contenía 439 µg de Pb al inicio del experimento, después de 26 días la planta absorbió aún más Pb del medio, lo cual muestra su tolerancia a la toxicidad de este metal y su capacidad para absorberlo. La viabilidad de *Lemna gibba* a la concentración del Pb en el medio es de hasta 500 ppm; más allá de ésta, las plantas mueren en unas horas.

En los dos regímenes lumínicos probados, la máxima absorción de Pb por *Lemna gibba* tuvo lugar a las 72 h de iniciado el experimento. En lo que se refiere a la tasa de crecimiento, el contenido de clorofilas a, b y total, y contenido de fenoles totales la

iluminación discontinua resultó más favorable que la iluminación continua, ésta última en cierta forma enmascara el efecto del Pb, como se aprecia gráficamente en los resultados. Además, la velocidad de absorción del Pb fue también mayor en iluminación discontinua.

Los elementos presentes en el medio de cultivo reaccionaron con el nitrato de plomo provocando un precipitado, de tal forma que no pudo efectuarse su cuantificación, así que las diluciones probadas en el experimento tres nos lleva a recomendar la de 1:40, donde la planta presenta un crecimiento óptimo y se evita la precipitación.

El experimento cuatro por las razones anteriores, se llevó a cabo sólo en iluminación discontinua y con una dilución del medio nutritivo de 1:40, éste mostró los valores máximos en la tasa de crecimiento al tercer día (72 h) en todos los tratamientos junto con el testigo, por lo que aunado al tiempo de absorción máxima de Pb, lo hace ser el tiempo óptimo para mantener a *Lemna gibba* en contacto con el medio en el tratamiento de agua contaminada por este metal.

Los contenidos de clorofilas a, b y total, fueron los esperados de acuerdo con la hipótesis planteada en donde el aumento del Pb en el medio afecta en forma directa a los contenidos de las clorofilas. Los efectos de clorosis (pérdida de clorofila) coinciden con lo anterior se aprecia en la Figura 4.20, donde en f) y en g), que corresponden a los tratamientos de 300 y 500 ppm respectivamente, los daños fueron muy evidentes. Como se mencionó en los antecedentes, el Pb inhibe a la síntesis de porfirina, la cual es clave en la síntesis de la molécula de clorofila.

Con referencia al Pb absorbido por *Lemna gibba*, se cuidó en el experimento cuatro que no hubiera Pb en el testigo, manteniendo las plantas por varias semanas en agua corriente antes de montar el experimento. La absorción se elevó en todos los tratamientos a las 72 h, seguido de una caída de los valores, aunque se notó que al sexto día vuelven a elevarse; estos datos no muestran relación con los del análisis del medio nutritivo en el mismo tiempo del experimento, donde los valores de los tratamientos con Pb regresan a los del inicio del experimento, los resultados del análisis de regresión denotan que no hay correlación entre estos dos parámetros (ver Anexo).

Se propone que tratando con *Lemna gibba*, durante 72 h el agua contaminada con Pb se obtiene la máxima absorción del metal, después de lo cual únicamente es necesario cosecharla. Para deshacerse del metal, una vez que se encuentra en el tejido vegetal de *Lemna gibba*, puede ser incinerado este material y posteriormente aislado enterrándose en salinas.

La tabla 4.2 muestra los resultados de los parámetros bioquímicos; en ella se hace evidente que el almidón soluble disminuye por el efecto del Pb, mientras que sus intermediarios primarios, los azúcares libres totales, aumentan hasta la concentración de 300 ppm de Pb; posiblemente se debe a que el Pb interviene en esta vía de síntesis; los análisis de regresión de ambos parámetros indican que no hay correlación entre ellos (ver Anexo).

De manera similar, las proteínas solubles totales disminuyen mientras que sus intermediarios primarios, los aminoácidos libres totales, llegan a sus valores máximos en la concentración de 300 ppm de Pb, señalando que probablemente esta vía metabólica

también se afecta; el análisis de regresión indica que no hay correlación entre ellos. (ver Anexo).

Como se mencionó en los antecedentes, el Pb tiene afinidad por los grupos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas, alterando su forma y función. Estos resultados concuerdan con los reportados con *Lemna minor* tratada con Zn y Cu (Bassi y Sharna 1993). Con plantas terrestres tratadas con metales pesados, también se han encontrado respuestas en la disminución del contenido de proteínas y aumento en los azúcares libres (Naidu 1991; Alia 1991, y Antikainen y Pihakaski 1994). Además, se reporta que el Pb incrementa la acumulación del polipeptido 16×10^3 M en *Lupinus luteus* (Przymusinsky y Gwozdz 1994). Se han observado cambios en *Salvinia molesta*, con reducción en las proteínas solubles y el almidón, e incremento en los azúcares libres al tratarla experimentalmente con hidrasida maleica (Kalyani 1985).

Los resultados del incremento en los fenoles totales en *Lemna gibba* ante la presencia del Pb, es una respuesta generalizada de las plantas frente a un factor de estrés. Otros factores que inducen la síntesis de fenoles son las infecciones provocadas por plagas y el envejecimiento (Bell 1981; Zobel 1990; Halloin 1994). Se ha reportado que los fenoles juegan un papel como sustancias quelantes ante la presencia de metales pesados (Taiz y Zeifer 1991).

En el estudio histoquímico se observa que las proteínas, el almidón y los fenoles presentaron en el tejido parenquimático de *Lemna gibba* respuestas a través de las tinciones, de manera que coinciden con las cuantificaciones bioquímicas de estos

parámetros; éste estudio, aunque es de tipo cualitativo y muy general, resultó de gran interés porque lleva a conocer acerca de las modificaciones que el Pb provoca a nivel tisular en la macrofita aquí analizada.

Un aspecto interesante sobre el uso de *Lemna gibba*, en el tratamiento de aguas contaminadas con Pb, o cualquier otro contaminante, debe considerar el hecho de que esta macrofita acuática ocupa la capa superficial del agua, es decir, que la absorción que realiza es aproximadamente de los primeros 10 cm de profundidad, razón por la cual los estanques o lagunas de regulación donde se utilice esta planta no deben tener una profundidad elevada. Después de 72 h, las plantas necesitan cosecharse e incinerarse y enterrar las cenizas en suelos salinos de tal manera que el metal pesado quede inactivo. Se ha sugerido que se destinen terrenos aislados de zonas urbanas que sirvan de colectores de residuos tóxicos. Este es uno de los problemas más importantes a resolver por los gobiernos de países industrializados.

VI. CONCLUSIONES

- *Lemna gibba* es una planta tolerante a la toxicidad del Pb.
- El tiempo óptimo de remoción de Pb son 72 h a partir de que *Lemna gibba*, se pone en contacto con el agua contaminada, después del cual hay que cosechar la macrofita.
- La iluminación discontinua favorece la velocidad de absorción de Pb por *Lemna gibba*.
- La iluminación discontinua también resulta favorable para detectar el efecto del Pb sobre los parámetros estudiados en *Lemna gibba*, ya que en iluminación continua tales efectos se enmascaran
- Los síntomas de clorosis coinciden con la disminución de las clorofilas a , b y total en *Lemna gibba*, en función del aumento de la concentración de Pb en el medio.
- El Pb afecta la síntesis de almidón soluble total en *Lemna gibba*, de tal suerte que los azúcares libres totales precursores del primero, muestran un notable incremento hasta los 300 mg/L.
- El Pb afecta la síntesis de proteínas en *Lemna gibba*, presentándose un incremento en sus precursores, los aminoácidos libres totales, hasta los 300 mg/L.

- Los fenoles totales se sintetizan en *Lemna gibba* ante la presencia del Pb, de manera semejante a las respuestas de otras plantas sometidas a diversos tipos de estrés, como son la carencia de agua, las bajas temperaturas, las infecciones y el envejecimiento.
- Los conocimientos que se derivan de este estudio, permiten optimizar el uso de *Lemna gibba* en el tratamiento terciario de aguas residuales municipales.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ALAERTS, G., RAHMAN, M. Y KELDERMAN, P. 1996. Performance analysis of a full-scale duckweed-covered sewage lagoon. **Wat. Res.** **30(4)**: 843-852.
- ALBERT, L. 1988. *Toxicología Ambiental*. Ed. Limusa, S.A. México. pp 101-122.
- ALLOWAY, B. 1990. *Heavy Metals in Soils*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 177-196
- ALIA, S. 1991. Proline accumulation under heavy metals stress. **J. Plant Physiol.** **138**: 504-508
- ANTIKAINEN, M. y S. PIHAKASKI. 1994. Early developments in RNA, Protein and sugar levels during cold stress in winter rye (*Secale cereale*) leaves. **Annals of Botany** **74**: 335-341.
- APHA 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and wastewater*, 17th ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
- ARNON, D. 1949. Copper enzyme in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol** **24**: 1-15.
- BASSI, R. y S. SHARMA. 1993. Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor* L. **Annals of Botany** **72**:151-154.
- BADILLO, J. 1988. Plomo. En: Noriega, Ed. *Curso básico de toxicología ambiental*. Limusa. México. pp. 105-121
- BARCELÓ, J., POSCHENRIEDER, CH., VÁZQUEZ, M., y B. GUNSE. 1989. *Synergism between cadmium- induced ion stress and drought*. In: M. Öztürk edit. Plant and pollutants in developed countries. Ege University, Izmir.
- BELL, A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annu. Rev. Plant. Physiol.** **32**: 21-81.
- BENDA, F. y J. KOUBA. 1991. Chemical Speciation and Bioavailability of Cu (II). Study of Ionic Copper (II) and Bis (glycinate)- Copper (II) Acumulation by *Lemna* Species. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **46**: 466-472
- BUCKLEY, J. 1994. The bioavailability of copper in wastewater to *Lemna minor* L. with biological and electrochemical measures of complexation. **Wat. Res.** **28(12)**: 2457-2467.
- CANIZARES, R. 1996. Efecto del cadmio y de la mezcla cadmio-zinc sobre el metabolismo celular de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* en sistemas libres e inmovilizados. Tesis doctoral. CINVESTAV. IPN. 233 p.

CHAWLA, G., SINGH, J. y P. VISWANATHAN. 1991. Effect of pH and Temperature on the Uptake of Cadmium by *Lemna minor* L. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 47: 84-90

CHEDIACK, R. 1988. Prólogo. En: Noriega, Ed. *Curso básico de toxicología ambiental*. Limusa, México, pp. 1-6.

COOK, C., SGARDELIS, S., PNTIS, J., y T. LANARAS. 1994. Concentrations of Pb, Zn, and Cu in *Taraxacum spp.* in relation to urban pollution. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 53: 204-210.

COREY, G. y L. GALVAO. 1989. *Plomo*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud; Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. pp. 5-11.

CULLEY, D. REJMANKOVA, E., KUET, J., y J. FRYE. 1981. Production, chemical quality and use of duckweeds (Lemnaceae) in aquaculture, waste management and animal feeds. **J. World Maricult. Soc.** 12: 27-49.

DE LANGE, L. 1975. Gibbosity in the complex *Lemna gibba* / *Lemna minor*, literature survey and ecological aspects. **Aquat. Bot.** 1:345-363.

DIRILGEN, N. y Y. INEL. 1994. Cobalt/copper and cobalt/zinc effects on duckweed growth and metal accumulation. **J. Environ. Sci. Health A29(1)**: 63-81

DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P. y SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** 28: 300-306.

EDWARDS, P., HASSAN, M., CHAO, C. y PACHARAPRIKITI, C. 1992. Cultivation of duckweeds on septage-loaded earthen ponds. **Bioresource Tech.** 40: 109-117.

FILBIN, G. y R. HOUGH. 1979. The effects of excess copper sulfate on the metabolism of the duckweed *Lemna minor*. **Aquat. Bot.** 7: 79-86.

FINKELMAN, J., COREY, G. Y R. CALDERÓN. 1994. *Epidemiología ambiental: Un proyecto para América Latina y el Caribe*. Organización Mundial de la Salud. Agencia de Protección Ambiental U.S.A. Programa Internacional sobre Seguridad Química. Red Epidemiológica Ambiental. pp. 116-127.

FITTER, A., y R. HAY. 1987. *Environmental Physiology of Plants*. Academic Press Inc. San Diego, CA U.S.A. pp 225-257.

GARG, P., CHANDRA, P. y S. DEVI. 1994. Chromium (VI) induced morphological changes in *Limnathemum cristatum* Griseb: A possible bioindicator. **Phytomorphology** 44(3 y 4): 201-206.

GLANDON, R. y C. MCNABB. 1978. The uptake of boron by *Lemna minor* L. **Aquat. Bot.** 4: 53-64.

GOLDBERG, A. 1989. Classification, Evolution, and Phylogeny of the Families of Monocotyledons. **Smithsonian Contributions to Botany** 71: 39.

GORGHAM, P. 1950. Heterotrophic nutrition of seed plants with particular reference to *Lemna minor* L. **Can. J. Res.** 28: 356-381.

GRILL, E., WINNACKER, E. y M. ZENK. 1985. Phytochelatins: The principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. **Science** 230: 674-676.

GUPTA, C. 1982. Use of water hyacinth in wastewater treatment (A brief literature review) **Abs. J. Environ. Health** 43(2): 80-82.

HALLOIN, J. 1994. Localization of phenolic compounds in crowns and roots of healthy and *Rhizoctonia solani* infected sugar beets. **Plant. Sci.** 99 : 223-228.

HARRISON, P. y C. DURANCE. 1989. Seasonal variations in phenolic content of elgrass shoots. **Aquat. Bot.** 35 : 409-413.

HAUSTEIN, A., GILLMAN, W. y SKILLICORN, P. 1990. Duckweed, a useful strategy for feeding chickens in Third World countries: performance of layers fed with sewagegrown Lemnaceae. **Poultry Sci.** 69: 1835-1844.

HEISEY, R. y A. DAMMAN. 1982. Copper and lead uptake by aquatic macrophytes in Eastern Connecticut, U.S.A. **Aquat. Bot.** 14: 213-230.

HILLMAN, W. 1961. The Lemnaceae, or duckweeds. A review of the descriptive and experimental literature **Bot. Rev.** 27: 221-287

HUEBERT, D. Y J. SHAY. 1992. The Effect of EDTA on Cadmium and Zinc Uptake and Toxicity in *Lemna trisulca* L. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 22:313-318.

JAIN, S.; VASUDEVAN, P. y N. JHA. 1988. Removal of some heavy metals from polluted water by aquatic plants: Studies on duckweed and water velvet. **Biological Wastes** 28: 115-126.

KALYANI, V.; KATHIRESAN, K. y J. GNANARETHINAM. 1985. Meic Hidrazida induced changes in the physiology of *Salvinia molesta* Mitch. **Aquat. Bot.** 21: 195-200.

KAWABATA Z., TATSUKAWA, R. y SATO, K. 1986. Growth of duckweed and nutrient removal in a paddy field irrigated with sewage effluent. **Int. J. Environ. Studies.** 27: 277-285.

KRISHNAMURTY, K. 1988. *Methods in Plant Histochemistry*. S. Viswanathan Pub. Madras, India. 90 p.

KWAN, K. y S. SMITH. 1988. The effect of thallium on the growth of *Lemna minor* and plant tissue concentrations in relation to both exposure and toxicity. **Environ. Pollut.** (Series A) **52**: 203-219.

KWAN, K. y S. SMITH. 1991. Some aspects of the kinetics of cadmium and thallium uptake by fronds of *Lemna minor* L. **New Phytol** **117**:91-102.

LANDOLT, E. 1987. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae) (vol.4) "*Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes ETH, Stiftung Rübel, Zürich*" pp. 131-133.

LANDOLT, E. 1975. Morphological differentiation and geographical distribution of *Lemna gibba*/*Lemna minor* group. **Aquat. Bot.** **1**: 327-332.

LARCHER, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer (3.) Nueva York. Pp.327-333, 424-432.

LEE, R. 1972. National Air Surveillance Cascade Impactor Network. II. Size Distribution Measurements of Trace Metal-Componentes. **Environ. Sci. Tech.** **6**(12):1025-1030

LESTER, J. 1987. *Heavy Metals in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. Vols. I y II. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. y RANDALL, R. 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**: 265-275.

MC CREADY, R. ; GUGGOLZ, J. SILVIERA, V y OWENS, H. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. **Anal. Chem.** **22**:1156

MINER, J. 1971. Water Hyacinth to further treat anaerobic lagoon effluent. In: *Livestock Waste Management and Pollution Abatements*, Proc. Int. Sym. on Livestock Wastes **Am. Soc. Agric. Eng. Proc.** 170-172.

MURAMOTO, S. y OKI, Y. 1983. Removal of some heavy metals from polluted water by water hyacinth. **Bull. Environ. Contam. Toxicol** **30**: 170-177.

NAIDU, B., PALEG, L., ASPINALL, D., JENNINGS, A. y JONES, G. 1991. Aminoacid and glycine betaine accumulation in cold-stressed wheat seedlings. **Phytochemistry** **30**: 407-409.

NATUSCH, W. y EVANS, C. 1974. Toxic Trace Elements: Preferential Concentration in Respirable Particles. **Science** **83**:202-204

- NGO VIET, 1987. Boosting pond performance with aquaculture. *Operations Forum. (WPCF)* 4(8): 20-23.
- NRIAGU, J. 1974. Lead orthophosphates- IV. Formation and stability in the environment. *Geo. Cosmoch. Acta* 38: 887-898
- OEGREN, E. y G. OEQUIST, 1984a. Photoinhibition of photosynthesis in *Lemna gibba* as induced by the interaction between light and temperatura II. Photosynthetic electron transport. *Physiol. Plant* 62(2): 187-192.
- ORON, G. 1990. Economic considerations in wastewater treatment with duckweed for effluent and nitrogen renovation. *Research Journal WPCF* 62(5): 692-696.
- ORON G., JANSEN, H. y PORATH, D. 1987. Performance of the duckweed species *Lemna gibba* on municipal wastewater for effluent renovation and protein production. *Biotech. Bioengin.* 29: 258-268.
- ORON G. y WILLERS, H. 1989. Effect of wastes quality on treatment efficiency with duckweed. *Wat. Sci. Technol.* 21: 639-645.
- PATTERSON, J. 1985. *Industrial Wastewater Treatment Technology*, Butterworth-Heinemann pp 175-190.
- PENNINGSFELD, F. y KURZMAN, P. 1975. *Cultivos Hidropónicos y en Turba*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. pp 53.
- PÉREZ, A. e I. DELEÓN. 1993. La contaminación por plomo en Coatzacoalcos. Instituto Politecnico Nacional. México. 111 p.
- PIETERS. A. 1975. Physiological, morphological and anatomical aspects of gibbosity in *Lemna gibba*. *Aquat. Bot.* 1: 333-344.
- PORATH, D., HEPHER, B. y KOTON, A. 1979. Duckweed as an aquatic crop. Evaluation of clones for aquaculture. *Aquat. Bot* 7 : 273-278.
- PORATH D. y POLLOCK, J. 1982. Ammonia striping by duckweed and its feasibility in circulating aquaculture. *Aquat. Bot.* 13: 125-135.
- PRASAD, D. y A. PRASAD. 1987. Effect of lead and mercury on chlorophyll synthesis in Mung bean seedlings. *Phytochemistry* 26: 881-883.
- PRZYMUSINSKI, R. y GWOZDZ, E. 1994. Increased accumulation of the 16×10^3 M, polypeptide in lupin roots exposed to lead, copper and nitrite ions. *Environ. Experimental Bot.* 34(1): 63-68.

- REDDY, K. y BUSK, W. 1985. Nutrient Removal Potential of Selected Aquatic Macrophytes. **J. Environ. Qual.** 14(4): 459-462.
- RODGERS, J., CHERRY, D. Y R. GUTHRIE. 1978. Cycling of elements in duckweed (*Lemna perpusilla*) in an ash settling basin and swamp drainage system. **Wat. Res.** 12: 765-770.
- ROHATGIN, y CHEN, K. 1975. Transport of trace metals by suspended particulates on mixing with seawater. **Jour. WPCF.** 47(9):2298-2316.
- SCULTHORPHE, C. 1967. *The Biology of Aquatic Vascular Plants*. Edward Arnold (Pub.) Ltd. Londres. pp 198-208.
- SHUANGXI, S. y WANG, X. 1991. The purifying efficiency and mechanism of aquatic plants in ponds. **Wat. Sci. Tech.** 24(5): 63-73.
- SKILLICORN, P., SPIRA, W. and Journey, W. 1993. *Duckweed Aquaculture*. The World Bank, Washington, D. C.
- STAVES, R. y R. KNAUS. 1985. Chromium removal from water by three species of duckweeds. **Aquat. Bot.** 23 (3): 261-273.
- STOVER, R., SOMMERS, L. y D. SILVIERA. 1979. Evaluation of metals in wastewater sludge **Wat. Res.** 48(9): 2165-2175.
- SWAIN, T. y HILLIS, W. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative estimation of phenolic constitution. **J. Sci. Food Agric.** 10: 63-68.
- TAIZ, L. y R. Zeifer. 1991. *Plant Physiology*. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. California. pp 318-345.
- TROLL, W. y CANAN, K. 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino-imino acids. **J. Biol. Chem.** 200: 803-811.
- VALLEE, B. y D. ULMER. 1972. Biochemical Effects of mercury, cadmium, and lead. **Ann. Rev. Biochem.** 41:91-128.
- WANG, W. 1990. Literature Review on Duckweed Toxicity Testing. **Environ. Res.** 52: 7-22.
- WEDGE, R. y BURRIS, J. 1982. Effects of light and temperatute on duckweed photosynthesis. **Aquat. Bot.** 12: 133-140.
- WEIGEL, H. 1985. The effect of Cd²⁺ on photosynthetic reactions of mesophyll protoplast. **Physiol. Plant.** 63: 192-200.

WOLVERTON, B., BARLOW, R. y MACDONALD, R. 1975. Application of vascular aquatic plants for pollution removal, energy and food production in biological system. **Nasa Tech. Mem. TN-X-72726.**

WOLVERTON, B. y MAC DONALD, R. 1978. Bioaccumulation and detection of trace levels of cadmium in aquatic systems by *Eichhornia crassipes*. **Environ. Health Perspect.** 27: 161-164

WOLVERTON, B. y MAC DONALD, R. 1979. Upgrading facultative wastewater lagoons with vascular aquatic plants. **J. Water Pollut. Control Fed.** 51: 305-312.

ZIRSCHKY J. y REED, S. 1988. The use of duckweed for wastewater treatment. **Wat. Pollut. Control Fed.** 60: 1253-1258.

ZOBEL, A. y J. NIGHWANDER. 1990. Accumulation of phenolic compounds in the necrotic areas of Austrian and red pine needles due to salt spray. **Annals of Botany** 66: 629-640.

ANEXO

Análisis de Rango Múltiple

Tasa de Crecimiento vs Tiempo.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 0 | 3 | .0000000 | X |
| 3 | 3 | .0203333 | X |
| 26 | 3 | .0690000 | X |
| 22 | 3 | .0700000 | X |
| 18 | 3 | .0800000 | X |
| 14 | 3 | .1000000 | X |
| 11 | 3 | .1200000 | X |
| 7 | 3 | .1400000 | X |

TABLAS DE ANOVA.

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-------------------|
| Tiempo | .0467232 | 7 | .0066747 | 3269.259 | .0000 |
| Error aleatorio | .0000327 | 16 | .0000020 | | |
| Total | .0467558 | 23 | | | |

Tabla 1. Tasa de crecimiento de *Lemna gibba* en función del tiempo (días).

TABLAS DE ANOVA.

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|----------------|-------------|-------------|---------------|-------------------------|-----------------------|
| Efectos Pples. | | | | | |
| Conc. Pb | .0004223 | 4 | .0001056 | 8.464 | .0000 |
| Tiempo | .0171299 | 7 | .0024471 | 196.214 | .0000 |
| Residual | .0013470 | 108 | 1.24718 E-005 | | |
| Total | .0188991 | 119 | | | |

Tabla 2. Tasa de crecimiento de *Lemna gibba* en función de tratamientos diferentes con Pb y del tiempo (días).

Análisis de Rango Múltiple

Tasa de Crecimiento vs Tratamientos con Pb.

| Method: 95 Percent LSD | | | |
|------------------------|-------|----------|--------------------|
| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
| 2 | 21 | .0276964 | X |
| 4 | 21 | .0289821 | XX |
| 0 | 24 | .0291250 | XX |
| 8 | 21 | .0301250 | X |
| 6 | 21 | .0339821 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Tasa de Crecimiento vs Tiempo.

| ----- | | | |
|------------------------|-------|----------|--------------------|
| Method: 95 Percent LSD | | | |
| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
| ----- | | | |
| 0 | 3 | .0008571 | X |
| 24 | 15 | .0288000 | X |
| 3 | 15 | .0306000 | XX |
| 20 | 15 | .0324000 | XX |
| 6 | 15 | .0336000 | X |
| 17 | 15 | .0340000 | X |
| 14 | 15 | .0372000 | X |
| 10 | 15 | .0424000 | X |
| ----- | | | |

TABLAS DE ANOVA.

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|---------------|-------------------------|-----------------------|
| Clorofila a | | | | | |
| Conc. Pb | .0015414 | 4 | 3.85356 E-004 | 5.497 | .0132 |
| Error aleatorio | .0007010 | 10 | 7.01040 E-005 | | |
| Total | .0022425 | 14 | | | |
| Clorofila b | | | | | |
| Conc. Pb | .0011478 | 4 | 2.86957 E-004 | 34.629 | .0000 |
| Error aleatorio | .0000829 | 10 | 8.28667 E-006 | | |
| Total | .0012307 | 14 | | | |
| Clorofila Total | | | | | |
| Conc. Pb | .00522069 | 4 | .0013017 | 14.598 | .0004 |
| Error aleatorio | .0008917 | 10 | .0000892 | | |
| Total | .0060986 | 14 | | | |

Tabla 3. Clorofilas a, b y total de *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos de Pb, al día 3 de crecimiento.

TABLAS DE ANOVA.

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|---------------|-------------|---------------|-------------------------|-----------------------|
| Clorofila a | | | | | |
| Conc. Pb | 1.3370196 | 4 | .3342549 | 1921.447 | .0000 |
| Error aleatorio | .0017396 | 10 | .0001740 | | |
| Total | 1.3387592 | 14 | | | |
| Clorofila b | | | | | |
| Conc. Pb | 3.15324 E-004 | 4 | 7.88310 E-005 | 743.689 | .0000 |
| Error aleatorio | 1.06000 E-006 | 10 | 1.06000 E-007 | | |
| Total | 3.16384 E-004 | 14 | | | |
| Clorofila Total | | | | | |
| Conc. Pb | 1.3077850 | 4 | .3269462 | 1877.944 | .0000 |
| Error aleatorio | .0017410 | 10 | .0001741 | | |
| Total | 1.3095260 | 14 | | | |

Tabla 4. Clorofilas a, b y total de *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos con Pb, al día 26 de crecimiento.

TABLAS DE ANOVA.

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| Efectos Pples. | | | | | |
| Clorofila a | | | | | |
| Conc. Pb | .62916 | 4 | .1572907 | 5.303 | .0033 |
| Tiempo | 2.7786 | 1 | 2.7786851 | 93.685 | .0000 |
| Residual | .7118378 | 24 | .0296599 | | |
| Total | 4.1196867 | 29 | | | |
| Clorofila b | | | | | |
| Conc. Pb | .0007703 | 4 | .0001926 | 5.950 | .0018 |
| Tiempo | .0167891 | 1 | .0167891 | 518.729 | .0000 |
| Residual | 7.76782 | 24 | 3.23659 | | |
| Total | .0183362 | 29 | | | |
| Clorofila Total | | | | | |
| Conc. Pb | .5892853 | 4 | .1473213 | 4.868 | .0051 |
| Tiempo | 2.3631572 | 1 | 2.3631572 | 78.084 | .0000 |
| Residual | .7263392 | 24 | .0302641 | | |
| Total | 3.678788 | 29 | | | |

Tabla 5. Clorofilas a, b y total de *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos con plomo y el tiempo (días).

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila "a" vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 2 | 3 | .0774000 | X |
| 4 | 3 | .0799000 | X |
| 6 | 3 | .0803000 | X |
| 0 | 3 | .0963000 | X |
| 8 | 3 | .1025000 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila "b" vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 2 | 3 | .0646000 | X |
| 6 | 3 | .0662000 | X |
| 4 | 3 | .0691000 | X |
| 8 | 3 | .0826000 | X |
| 0 | 3 | .0856667 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila "a" vs Tratamientos con Pb al día 26 del Experimento.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 8 | 3 | .1195000 | X |
| .0 | 3 | .7111000 | X |
| 6 | 3 | .8430000 | X |
| 4 | 3 | .8497000 | X |
| 2 | 3 | .9565000 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila "b" vs Tratamientos con Pb al día 26 del Experimento.

| Method: 95 Percent LSD | | | |
|------------------------|-------|----------|--------------------|
| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
| 0 | 3 | .0206000 | X |
| 6 | 3 | .0242000 | X |
| 4 | 3 | .0248000 | X |
| 2 | 3 | .0277000 | X |
| 8 | 3 | .0343000 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila Total vs Tratamientos con Pb al día 26 del Experimento.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 8 | 3 | .1538000 | X |
| 0 | 3 | .7317000 | X |
| 6 | 3 | .8672000 | X |
| 4 | 3 | .8745000 | X |
| 2 | 3 | .9840000 | X |

TABLAS DE ANOVA.

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| Conc. Pb | 1752.000 | 4 | 438.000 | 91.250 | .0000 |
| Error aleatorio | 48.000 | 10 | 4.800 | | |
| | | 14 | | | |
| Total | 1 800.000 | | | | |

Tabla 6 . Fenoles totales en función de diferentes tratamientos con Pb , al tercer día de crecimiento.

S.C. -Suma de cuadrados.

g.l.-grados de libertad.

C.M.-cuadrado medio

TABLAS DE ANOVA.

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-------------------|
| Conc. Pb | 11183912 | 4 | 2795978.1 | 999999.999 | .0000 |
| Error aleatorio | 24 | 10 | 2.4 | | |
| Total | 11183936 | 14 | | | |

Tabla 7. Contenido de Pb en *Lemna gibba* bajo diferentes tratamientos con Pb al día 26 de crecimiento.

Análisis de Rango Múltiple

Fenoles Totales vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 4 | 3 | 46.000000 | X |
| 6 | 3 | 52.000000 | X |
| 0 | 3 | 58.000000 | X |
| 2 | 3 | 68.000000 | X |
| 8 | 3 | 76.000000 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Pb en *Lemna gibba* vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 0 | 3 | 439.0000 | X |
| 8 | 3 | 2362.0000 | X |
| 2 | 3 | 2379.0000 | X |
| 4 | 3 | 2637.0000 | X |
| 6 | 3 | 2834.0000 | X |

TABLAS DE ANOVA.

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| Efectos Pples. | | | | | |
| Conc. Pb | .5024912 | 5 | .1004982 | 42.262 | .0090 |
| Tiempo | .7246862 | 7 | .1035266 | 43.535 | .0000 |
| Residual | .3138937 | 132 | .0023780 | | |
| Total | 1.5404632 | 144 | | | |

Tabla 8. Tasa de crecimiento de *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos con Pb y del tiempo (días), en luz continua.

TABLAS DE ANOVA.

| <i>Fuente</i> | <i>S.C</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|----------------|------------|-------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| Efectos Pples. | | | | | |
| Conc. Pb | .9515696 | 5 | .1903139 | 77.584 | .0000 |
| Tiempo | .7692354 | 7 | .1098908 | 44.799 | .0000 |
| Residual | .3213420 | 131 | .0024530 | | |
| | | | | | |
| Total | 2.0421470 | 143 | | | |

Tabla 9. Tasa de crecimiento de *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos con Pb y del tiempo (días), en luz discontinua.

S.C. -Suma de cuadrados.

g.l.-grados de libertad.

C.M.-cuadrado medio

TABLAS DE ANOVA.

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| Iluminación | 1.2645118 | 56 | .0225806 | 2.307 | .0002 |
| Error aleatorio | .8516122 | 87 | .0097886 | | |
| Total | 2.1161240 | 143 | | | |

Tabla 10. Tasa de crecimiento en función de las dos condiciones de iluminación (continua y discontinua).

Análisis de Rango Múltiple

Tasa de Crecimiento vs Tratamientos con Pb en Iluminación Continua.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 500 | 24 | .0558333 | X |
| 100 | 24 | .0808333 | X |
| 200 | 24 | .1570833 | X |
| 50 | 24 | .1800000 | XX |
| 30 | 24 | .1866667 | XX |
| 0 | 24 | .2275000 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Tasa de Crecimiento vs Tiempo en Iluminación Continua.

| Method: 95 Percent LSD | | | |
|------------------------|-------|----------|--------------------|
| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
| 0 | 18 | .0000000 | X |
| 7 | 18 | .1216667 | X |
| 3 | 18 | .1233333 | X |
| 24 | 18 | .1466667 | XX |
| 21 | 18 | .1650000 | XXX |
| 17 | 18 | .1822222 | XX |
| 14 | 18 | .2033333 | XX |
| 10 | 18 | .2416667 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Tasa de Crecimiento vs Tratamientos con Pb en Iluminación Discontinua.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 500 | 24 | .0564583 | X |
| 200 | 24 | .1329583 | X |
| 100 | 24 | .1650000 | X |
| 50 | 24 | .1683333 | X |
| 30 | 24 | .2795833 | X |
| 0 | 24 | .2891667 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Tasa de Crecimiento vs Tiempo en Iluminación Discontinua.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 0 | 18 | .0000000 | X |
| 24 | 18 | .1691667 | X |
| 3 | 18 | .1908333 | XX |
| 21 | 18 | .1931667 | XX |
| 17 | 18 | .2024444 | X |
| 14 | 18 | .2191667 | X |
| 7 | 18 | .2222222 | X |
| 10 | 18 | .2583333 | X |

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|----------------|--------------|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------|
| Efectos Pples. | | | | | |
| Conc. de Pb | 4.4897 E0010 | 5 | 8.9794 E0009 | 55.921 | .0000 |
| Tiempo | 1.9897 E0010 | 4 | 4.9743 E0009 | 30.979 | .0000 |
| Residual | 1.2846 E0010 | 80 | 1.6057 E0008 | | |
| Total | 7.7640 E0010 | 89 | | | |

Tabla 11. Contenido de Pb en *Lemna gibba* en función de tratamientos con Pb y del tiempo en iluminación continua.

S.C.-suma de cuadrados.

g.l.-grados de libertad.

C.M.-cuadrado medio.

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|----------------|---------------|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------|
| Efectos Pples. | | | | | |
| Conc. Pb | 1.9422 E0010 | 5 | 3.8844 E0009 | 38.146 | .0000 |
| Tiempo | 2.2685 E0010 | 4 | 5.6713 E0009 | 55.694 | .0000 |
| Residual | 8.1464 E0009 | 80 | 1.0183 0008 | | |
| Total | 5.0317 E 0010 | 89 | | | |

Tabla 12. Contenido de Pb en *Lemna gibba* en función de tratamientos con Pb y del tiempo en iluminación discontinua.

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|--------------|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------|
| Iluminación | 7.7640 E0010 | 60 | 1.2940 E0009 | 999.999 | .0000 |
| Error aleatorio | .0000 E0000 | 29 | .0000 E0000 | | |
| Total | 7.7640 E0010 | 89 | | | |

Tabla 13. Contenido de Pb en *Lemna gibba* en función de las dos condiciones de iluminación (continua y discontinua).

S.C.-suma de cuadrados.

g.l.-grados de libertad.

C.M.-cuadrado medio.

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Pb en *Lemna gibba* vs Tratamientos con Pb en Iluminación Continua.

| Method: 95 Percent LSD | | | |
|------------------------|-------|-----------|--------------------|
| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
| 0 | 15 | .000 | X |
| 30 | 15 | 10504.000 | X |
| 50 | 15 | 12889.733 | X |
| 100 | 15 | 45531.800 | X |
| 200 | 15 | 46126.333 | X |
| 500 | 15 | 60372.133 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Pb en *Lemna gibba* vs Tiempo en Iluminación Continua.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 0 | 18 | .000 | X |
| 24 | 18 | 32451.944 | X |
| 96 | 18 | 36317.111 | XX |
| 48 | 18 | 36396.167 | XX |
| 72 | 18 | 41021.444 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Pb en *Lemna gibba* vs Tratamientos con Pb en Iluminación Discontinua.

| ----- | | | |
|------------------------|-------|-----------|--------------------|
| Method: 95 Percent LSD | | | |
| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
| ----- | | | |
| 0 | 15 | .000 | X |
| 30 | 15 | 19586.000 | X |
| 50 | 15 | 26157.667 | XX |
| 100 | 15 | 31765.067 | XX |
| 200 | 15 | 38102.533 | X |
| 500 | 15 | 45997.333 | X |
| ----- | | | |

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Pb en *Lemna gibba* vs Tiempo en Luz Discontinua.

| Method: 95 Percent LSD | | | |
|------------------------|-------|-----------|--------------------|
| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
| 0 | 18 | .000 | X |
| 24 | 18 | 22483.556 | X |
| 48 | 18 | 27048.000 | X |
| 96 | 18 | 38731.000 | X |
| 72 | 18 | 46411.278 | X |

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------|
| Clorofila a | | | | | |
| Conc. Pb | .0021263 | 5 | 4.25256 E004 | 9.234 | .0008 |
| Error aleatorio | .0005527 | 12 | 4.60556 E005 | | |
| Total | .0026789 | 17 | | | |
| Clorofila b | | | | | |
| Conc. Pb | .0013118 | 5 | 2.62356 E004 | 6.364 | .0041 |
| Error aleatorio | .0004947 | 12 | 4.12222 E005 | | |
| Total | .0018064 | 17 | | | |
| Clorofila Total | | | | | |
| Conc. Pb | .0053709 | 5 | .0010742 | 10.520 | .0005 |
| Error aleatorio | .0012253 | 12 | .0001021 | | |
| Total | .0065963 | 17 | | | |

Tabla 14. Clorofilas a, b y total de *Lemna gibba* en función de diferentes concentraciones de Pb, al día 3 de crecimiento en luz continua.

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|--------------|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------|
| Clorofila a | | | | | |
| Conc. Pb | 2.86500 E004 | 4 | 5.73000 E005 | 12.279 | .0002 |
| Error aleatorio | 5.60000 E005 | 12 | 4.66667 E006 | | |
| Total | 3.42500 E004 | 17 | | | |
| Clorofila b | | | | | |
| Conc. Pb | .0010787 | 5 | 2.15733 | 43.631 | .0000 |
| Error aleatorio | .0000593 | 12 | 4.9444 E006 | | |
| Total | .0011380 | 17 | | | |
| Clorofila total | | | | | |
| Conc. Pb | .0020232 | 5 | 4.04633 E004 | 33.876 | .0000 |
| Error aleatorio | .0001433 | 12 | 1.19444 E005 | | |
| Total | .0021665 | 17 | | | |

Tabla 15. Clorofilas a, b y total de *Lemna gibba* en función de diferentes concentraciones de Pb, al día 3 de crecimiento en luz discontinua.

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila "a" vs Tratamientos con Pb en Iluminación Continua.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 500 | 3 | .0550000 | X |
| 0 | 3 | .0730000 | X |
| 200 | 3 | .0730000 | X |
| 100 | 3 | .0780000 | X |
| 50 | 3 | .0800000 | XX |
| 30 | 3 | .0913333 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila "b" vs Tratamientos con Pb en iluminación Continua.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 500 | 3 | .0600000 | X |
| 30 | 3 | .0750000 | X |
| 0 | 3 | .0800000 | X |
| 50 | 3 | .0810000 | X |
| 100 | 3 | .0833333 | X |
| 200 | 3 | .0860000 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila Total vs Tratamientos con Pb en Iluminación Continua.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 500 | 3 | .1150000 | X |
| 0 | 3 | .1530000 | X |
| 200 | 3 | .1590000 | X |
| 50 | 3 | .1610000 | X |
| 100 | 3 | .1613333 | X |
| 30 | 3 | .1663333 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila "a" vs Tratamientos con Pb en Iluminación Discontinua.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 500 | 3 | .0160000 | X |
| 30 | 3 | .0220000 | X |
| 0 | 3 | .0240000 | XX |
| 50 | 3 | .0240000 | XX |
| 200 | 3 | .0260000 | XX |
| 100 | 3 | .0290000 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila "b" vs Tratamientos con Pb en Iluminación Discontinua.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 500 | 3 | .0120000 | X |
| 50 | 3 | .0210000 | X |
| 30 | 3 | .0213333 | X |
| 200 | 3 | .0236667 | XX |
| 100 | 3 | .0260000 | X |
| 0 | 3 | .0380000 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila Total vs tratamientos con Pb en Iluminación Discontinua.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 500 | 3 | .0280000 | X |
| 30 | 3 | .0433333 | X |
| 50 | 3 | .0450000 | XX |
| 200 | 3 | .0496667 | XX |
| 100 | 3 | .0550000 | X |
| 0 | 3 | .0620000 | X |

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------|
| Iluminación | .0062031 | 13 | 4.77162 E004 | 4.855 | .0695 |
| Error aleatorio | .0003932 | 4 | 9.82917 E005 | | |
| Total | .0065963 | 17 | | | |

Tabla 16. Clorofilas totales de *Lemna gibba* en función de las dos condiciones de iluminación (continua y discontinua).

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C. M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|------------------|-------------------------|-----------------------|
| Iluminación | 1761.1250 | 12 | 146.76042 | 4.844 | .0466 |
| Error aleatorio | 151.5000 | 5 | 30.30000 | | |
| Total | 1912.6250 | 17 | | | |

Tabla 17. Contenido de fenoles totales en *Lemna gibba* en función de las dos condiciones de iluminación (continua y discontinua).

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Fenoles Totales vs Ambas Condiciones de Iluminación.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 4 | 3 | 46.000000 | X |
| 6 | 3 | 52.000000 | X |
| 0 | 3 | 58.000000 | X |
| 2 | 3 | 68.000000 | X |
| 8 | 3 | 76.000000 | X |

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| Conc. Pb | 215.16667 | 5 | 43.033333 | 6.509 | .0038 |
| Error aleatorio | 79.33333 | 12 | 6.611111 | | |
| Total | 294.50000 | 17 | | | |

Tabla 18. Contenido de fenoles totales en *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos con Pb.

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Fenoles Totales vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 0 | 3 | 44.000000 | X |
| 50 | 3 | 46.000000 | XX |
| 100 | 3 | 47.000000 | XX |
| 200 | 3 | 50.333333 | XX |
| 300 | 3 | 51.666667 | X |
| 500 | 3 | 54.000000 | X |

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| Conc. Pb | 1324.5844 | 5 | 264.91689 | 88.799 | .0000 |
| Error aleatorio | 35.8000 | 12 | 2.98333 | | |
| Total | 1360.3844 | 17 | | | |

Tabla 19. Contenido de almidón soluble total en *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos con Pb.

S.C.-suma de cuadrados.

g.l.-grados de libertad.

C.M.-cuadrado medio.

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Almidón Soluble Total vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 500 | 3 | 7.033333 | X |
| 300 | 3 | 14.333333 | X |
| 200 | 3 | 14.800000 | X |
| 100 | 3 | 15.666667 | X |
| 50 | 3 | 16.000000 | X |
| 0 | 3 | 35.100000 | X |

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| Conc. Pb | 1223.9111 | 5 | 244.78222 | 179.036 | .0000 |
| Error aleatorio | 16.4067 | 12 | 1.36722 | | |
| Total | 1240.3178 | 17 | | | |

Tabla 20. Contenido de azúcares libres totales en *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos con Pb.

S.C.-suma de cuadrados.

g.l.-grados de libertad.

C.M.-cuadrado medio.

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Azúcares Libres Totales vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 0 | 3 | 48.066667 | X |
| 50 | 3 | 53.000000 | X |
| 100 | 3 | 57.000000 | X |
| 200 | 3 | 59.000000 | X |
| 500 | 3 | 68.000000 | X |
| 300 | 3 | 72.000000 | X |

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| Conc. Pb | 1630.9267 | 5 | 326.18533 | 689.934 | .0000 |
| Error aleatorio | 5.67733 | 12 | .47278 | | |
| Total | 1636.6000 | 17 | | | |

Tabla 21. Contenido de proteínas solubles totales en *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos con Pb.

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Proteínas Solubles Totales vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 500 | 3 | 1.300000 | X |
| 300 | 3 | 1.500000 | X |
| 200 | 3 | 3.266667 | X |
| 100 | 3 | 5.833333 | X |
| 50 | 3 | 11.400000 | X |
| 0 | 3 | 28.500000 | X |

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-------------------|
| Conc. Pb | 2007.5161 | 5 | 401.50322 | 3631.687 | .0000 |
| Error aleatorio | 1.3267 | 12 | .11056 | | |
| Total | 2008.8428 | 17 | | | |

Tabla 22. Contenido de aminoácidos libres totales en *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos con Pb.

S.C.-suma de cuadrados.

g.l.-grados de libertad.

C.M.-cuadrado medio.

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Aminoácidos Libres Totales vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

0 3 11.333333 X
50 3 11.666667 X
100 3 15.000000 X
200 3 17.966667 X
500 3 31.766667 X
300 3 39.100000 X

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|----------------|-------------|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------|
| Efectos Pples. | | | | | |
| Conc. Pb | .0377376 | 5 | .0075475 | 20.711 | .0000 |
| Tiempo | .1347533 | 4 | .0336883 | 92.443 | .0000 |
| Residual | .0236874 | 65 | 3.64421 E004 | | |
| Total | .1825289 | 74 | | | |

Tabla 23. Tasa de crecimiento de *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos con Pb y del tiempo (días).

Análisis de Rango Múltiple

Tasa de Crecimiento vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 500 | 12 | .0155805 | X |
| 300 | 12 | .0290055 | XX |
| 200 | 11 | .0355321 | X |
| 100 | 13 | .0418984 | X |
| 50 | 12 | .0656872 | X |
| 0 | 15 | .0837780 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Tasa de Crecimiento vs Tiempo.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 0 | 3 | -.0385311 | X |
| 13 | 18 | .0275183 | X |
| 9 | 18 | .0410967 | X |
| 6 | 18 | .0675341 | X |
| 3 | 18 | .1286167 | X |

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|-----------------|-------------|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------|
| Clorofila a | | | | | |
| Conc. Pb | .0023912 | 5 | 4.78244 E004 | 55.913 | .0000 |
| Error aleatorio | .0001026 | 12 | 8.55333 E006 | | |
| Total | .0024939 | 17 | | | |
| Clorofila b | | | | | |
| Conc. Pb | .0023213 | 5 | 4.64264 E004 | 33.114 | .0000 |
| Error aleatorio | .0001682 | 12 | 1.40200 E005 | | |
| Total | .0024896 | 17 | | | |
| Clorofila Total | | | | | |
| Conc. Pb | .0092398 | 5 | .0018480 | 70.439 | .0000 |
| Error aleatorio | .0003148 | 12 | .0000262 | | |
| Total | .0095546 | 17 | | | |

Tabla 24. Clorofilas a, b y total de *Lemna gibba* en función de diferentes concentraciones de Pb, al día 3 de crecimiento.

S.C.-suma de cuadrados.

g.l.-grados de libertad.

C.M.-cuadrado medio.

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila "a" vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 500 | 3 | .0147000 | X |
| 200 | 3 | .0153000 | X |
| 100 | 3 | .0161000 | X |
| 50 | 3 | .0173000 | X |
| 300 | 3 | .0183000 | X |
| 0 | 3 | .0471000 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila "b" vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 50 | 3 | .0177000 | X |
| 500 | 3 | .0192000 | XX |
| 100 | 3 | .0200000 | XXX |
| 200 | 3 | .0258000 | XX |
| 300 | 3 | .0261000 | X |
| 0 | 3 | .0510000 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Clorofila Total vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|----------|--------------------|
| 500 | 3 | .0339000 | X |
| 50 | 3 | .0350000 | X |
| 100 | 3 | .0361000 | XX |
| 200 | 3 | .0411000 | XX |
| 300 | 3 | .0444000 | X |
| 0 | 3 | .0981000 | X |

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel de Sig.</i> |
|----------------|--------------|-------------|--------------|-------------------------|--------------------------|
| Efectos Pples. | | | | | |
| Conc. Pb | 1.2513 E0011 | 5 | 2.5026 E0010 | 142.291 | .0000 |
| Tiempo | 8.8689 E0010 | 6 | 1.4781 E0010 | 84.044 | .0000 |
| Residual | 2.0050 E0010 | 114 | 1.7588 E0008 | | |
| Total | 2.3387 E0011 | 125 | | | |

Tabla 25. Contenido de Pb en *Lemna gibba* en función de diferentes tratamientos con plomo y del tiempo (días).

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Pb en *Lemna gibba* vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 0 | 21 | .000 | X |
| 50 | 21 | 61879.000 | X |
| 100 | 21 | 80063.286 | X |
| 200 | 21 | 84590.286 | XX |
| 500 | 21 | 86829.905 | XX |
| 300 | 21 | 90893.286 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Pb en *Lemna gibba* vs Tiempo.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 0 | 18 | .00 | X |
| 1 | 18 | 40618.72 | X |
| 4 | 18 | 44326.67 | XX |
| 5 | 18 | 50901.72 | XX |
| 2 | 18 | 54089.50 | X |
| 3 | 18 | 66560.17 | X |
| 7 | 18 | 107013.67 | X |
| 6 | 18 | 108121.28 | X |

TABLAS DE ANOVA

| <i>Fuente</i> | <i>S.C.</i> | <i>g.l.</i> | <i>C.M.</i> | <i>Proporción F</i> | <i>Nivel Sig.</i> |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------|-----------------------|
| Efectos Pples. | | | | | |
| Conc. Pb | 3829544.8 | 5 | 765908.96 | 4877.851 | .0000 |
| Tiempo | 19737.2 | 7 | 2819.61 | 17.957 | .0000 |
| Residual | 20569.318 | 131 | 157.01769 | | |
| Total | 3869851.4 | 143 | | | |

Tabla 26. Contenido de Pb en el medio nutritivo en función de los diferentes tratamientos con Pb y del tiempo (días).

S.C. -suma de cuadrados.

g.l.-grados de libertad.

C.M.-cuadrado medio.

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Pb en Medio Nutritivo vs Tratamientos con Pb.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 0 | 24 | .00000 | X |
| 50 | 24 | 23.59375 | X |
| 100 | 24 | 76.58750 | X |
| 200 | 24 | 160.55583 | X |
| 300 | 24 | 262.29833 | X |
| 500 | 24 | 473.29667 | X |

Análisis de Rango Múltiple

Contenido de Pb en Medio Nutritivo vs Tiempo.

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | LS Mean | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 1 | 18 | 148.60389 | X |
| 2 | 18 | 157.29444 | X |
| 3 | 18 | 159.08833 | X |
| 4 | 18 | 162.01167 | XX |
| 5 | 18 | 169.24167 | XX |
| 6 | 18 | 169.59167 | XX |
| 7 | 18 | 172.29111 | X |
| 0 | 18 | 190.32000 | X |

Análisis de Regresión

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + bX$

 Dependent variable: GRAF18.PbenLemma Independent variable: GRAF19.Pbenmedi

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Value | Prob. Level |
|-----------|----------|----------------|---------|-------------|
| Intercept | 42371.1 | 5141.29 | 8.24134 | .00000 |
| Slope | 99.8633 | 22.0333 | 4.53238 | .00001 |

Analysis of Variance

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | Prob. Level |
|---------------|----------------|-----|-------------|------------|-------------|
| Model | 3.8593E0010 | 1 | 3.8593E0010 | 2.054E0001 | .00001 |
| Residual | 2.6677E0011 | 142 | 1.8787E0009 | | |
| Total (Corr.) | 3.0537E0011 | 143 | | | |

Correlation Coefficient = 0.355503 R-squared = 12.64 percent
 Stnd. Error of Est. = 43343.8

Análisis de Regresión

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + bX$

 Dependent variable: TABLA4.azucares

Independent variable: TABLA2.almidon

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Value | Prob. Level |
|-----------|-----------|----------------|----------|-------------|
| Intercept | 71.4405 | 3.14634 | 22.7059 | .00000 |
| Slope | -0.695363 | 0.163595 | -4.25053 | .00061 |

Analysis of Variance

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | Prob. Level |
|----------|----------------|----|-------------|---------|-------------|
| Model | 657.78643 | 1 | 657.78643 | 18.0670 | .00061 |
| Residual | 582.53135 | 16 | 36.40821 | | |

Total (Corr.) 1240.3178 17

Correlation Coefficient = -0.728242

R-squared = 53.03 percent

Std. Error of Est. = 6.03392

Análisis de Regresión

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + bX$

 Dependent variable: TABLA5.aminoacido Independent variable: TABLA3.proteina

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Value | Prob. Level |
|-----------|-----------|----------------|----------|-------------|
| Intercept | 27.3545 | 2.70794 | 10.1016 | .00000 |
| Slope | -0.719958 | 0.210522 | -3.41988 | .00351 |

Analysis of Variance

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | Prob. Level |
|----------|----------------|----|-------------|---------|-------------|
| Model | 848.31456 | 1 | 848.31456 | 11.6956 | .00351 |
| Residual | 1160.5282 | 16 | 72.5330 | | |

 Total (Corr.) 2008.8428 17
 Correlation Coefficient = -0.649839 R-squared = 42.23 percent
 Stnd. Error of Est. = 8.51663