

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**“Mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de Pb^{2+} en
Salvinia minima”**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

M en C. Gloria Sánchez Galván

Co-directores de tesis:

Dr. Jorge Gómez Hernández

Dra. Eugenia J. Olguín Palacios

Asesor:

Dr. Oscar Monroy Hermosillo

Julio de 2010

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

El jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas de la

UAM (Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco)

aprobó la Tesis que presentó

GLORIA SÁNCHEZ GALVÁN

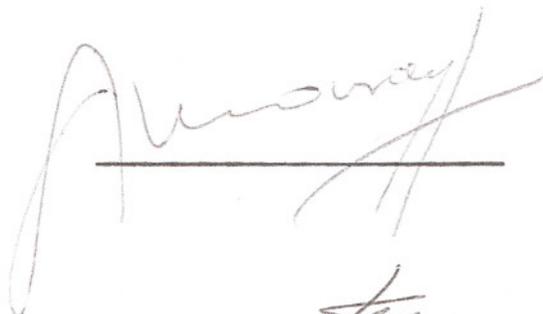
el día 23 de Julio de 2010.

Sinodales:

Dr. Jorge Gómez Hernández (Presidente)



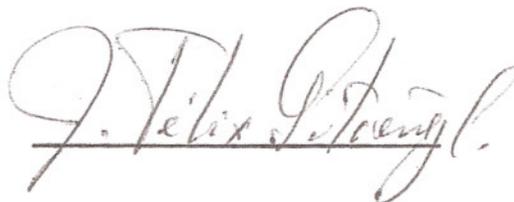
Dr. Oscar Monroy Herмосillo (Secretario)



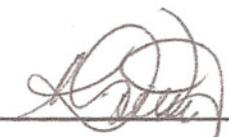
Dra. Eugenia J. Olguín Palacios (Vocal)



Dr. J. Félix Gutiérrez Corona (Vocal)



Dra. Katiushka Arévalo Niño (Vocal)



COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTORES DE TESIS

Dr. Jorge Gómez Hernández
Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. Eugenia J. Olguín Palacios
Instituto de Ecología, A.C.

ASESOR

Dr. Oscar Monroy Hermosillo
Universidad Autónoma Metropolitana

SINODALES

Dr. J. Félix Gutiérrez Corona
Universidad de Guanajuato

Dr. Katiushka Arévalo Niño
Universidad Autónoma de Nuevo León

El presente trabajo se realizó en el grupo de biotecnología ambiental de la Red de Manejo Biotecnológico de Recursos del Instituto de Ecología y fue parte del proyecto P-46697-Z “Mecanismos pasivos y activos de remoción de Pb y Cd por la comunidad *Salvinia minima*-microalgas rizosféricas y por *Arthrospira maxima* y de degradación y/o bioacumulación de bisfenol-A y 17-beta estradiol (E2) por *Anabaena* sp y *Phormidium bohneri*”, financiado por CONACYT y cuya responsable fue la Dra. Eugenia J. Olguín Palacios.

Agradecimientos

A Aquel quien es fiel y verdadero y digno de alabanza, YESHUA HA MASHIAJ.

A mi mamá y mi papá por su amor y apoyo incondicional.

A mi hermana y mi cuñado por su amor, apoyo y cercanía a pesar de la distancia.

A mis familiares y amigos de Amistad, gracias por ocuparse de mí.

Gracias a Eugenia por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y conocer el mundo de la investigación, por su apoyo para alcanzar este objetivo y por su amistad de tantos años.

Al INECOL por haberme brindado las facilidades para desarrollar este trabajo.

Al Dr. Jorge Gómez por la oportunidad de conocerle como investigador y como persona, por su apoyo y aportaciones a este trabajo.

Al Dr. Oscar Monroy por su apoyo y aportaciones al trabajo.

A los sinodales, la Dra. Katiushka Arévalo y al Dr. Félix Gutiérrez por su tiempo y disposición para participar en este proceso.

Al personal y estudiantes del Grupo de Biotecnología Ambiental del Inecol que colaboraron para la realización de este trabajo.

A la Dra. Reyna Fierro Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biológicas por su apoyo siempre que lo necesité.

Al personal de la UAM-I por apoyarme en toda ocasión (Bety, Lety, Paty y Violeta).

RESUMEN

La fitorremediación es una tecnología ambientalmente pertinente que ha resultado muy útil como método alternativo a las tecnologías convencionales, para el tratamiento de aguas residuales. Dentro de este contexto, los sistemas con plantas acuáticas han demostrado ser eficientes para eliminar metales. En estudios previos se encontró que la adsorción y la acumulación intracelular, en ausencia de nutrientes, son los principales mecanismos de eliminación de Pb^{2+} por *Salvinia minima* en sistemas de lagunas operadas por lote. Asimismo, se demostró que este helecho acuático es hiperacumulador de Pb^{2+} (Olgúin et al., 2005). Sin embargo, es necesario generar más conocimiento para entender los mecanismos básicos participantes en la hiperacumulación del metal, lo que permitirá coadyuvar en la optimización de las fitotecnologías para el tratamiento de efluentes que utilizan plantas hiperacumuladoras. El presente trabajo es una contribución al conocimiento de algunos de los factores y mecanismos participantes en la hiperacumulación de Pb^{2+} en *Salvinia minima* a diferentes niveles, lo que coadyuvará en la evaluación de la hiperacumulación de metales en otras plantas de este tipo. Se describen por primera vez las características fisicoquímicas de *Salvinia minima* siendo, el área superficial ($264 \text{ m}^2/\text{g}$) y el contenido de grupos carboxilo ($0.95 \text{ mmol}/\text{H}^+$), dos de las más importantes en la acumulación de metales. Se determinó y evaluó la hiperacumulación de Pb^{2+} en un amplio intervalo de concentraciones iniciales (C_i) de Pb^{2+} (0.8 ± 0.00 , 2.70 ± 0.03 , 4.70 ± 0.06 , 15.18 ± 0.55 y $28.40 \pm 0.22 \text{ mg Pb}^{2+}/\text{L}$) y tiempos de exposición (0.5, 2, 4, 6, 8 y 24 h) en presencia de ciertos compuestos orgánicos e inorgánicos (ácido propiónico y sulfato de magnesio). Basado en un análisis de compartimentalización, se propusieron dos factores novedosos tales como el factor de adsorción (FAD) y el factor de acumulación intracelular (FAI) para obtener un mayor entendimiento sobre la hiperacumulación de Pb^{2+} en la planta. Este proceso se debe principalmente a la adsorción (FAD en el intervalo de 780 a 1980), resultado de sus extraordinarias características fisicoquímicas. Asimismo, se encontró que el Pb^{2+} fue acumulado intracelularmente a C_i tan altas como $28.40 \pm 0.22 \text{ mg Pb}^{2+}/\text{L}$

(FAI en el intervalo de 57 a1007). Además, se presenta un análisis cinético de dichos mecanismos a partir del cual la quimioadsorción fue inferida como el mecanismo específico responsable de la adsorción de Pb^{2+} , de acuerdo al modelo de adsorción de pseudo-segundo orden. La acumulación intracelular también contribuyó a la hiperacumulación de Pb^{2+} en *S. minima* y parece estar descrita por el modelo de Michaelis-Menten.

Palabras claves: helecho acuático, metal pesado, fitorremediación, lagunas, hiperacumulación.

ABSTRACT

Phytoremediation is an environmentally sound technology that has shown to be very efficient for the treatment of wastewaters. Treatment systems using aquatic plants have proven to be efficient to remove metals. Previously, it was found that the main Pb^{2+} removal mechanism, in batch-operated lagoons with *Salvinia minima*, was adsorption, followed by intracellular accumulation. Furthermore, *S.minima* was shown to be a Pb^{2+} hyperaccumulator (Olguín et al., 2005). However, more information is required to understand the mechanisms involved in metal hyperaccumulation and to contribute to the optimization of phytotechnologies using hyperaccumulating plants. This work is a contribution to understand some factors and mechanisms involved in the Pb^{2+} hyperaccumulation, in *Salvinia minima* at different levels, which will be very useful for the metal hyperaccumulation assessment in other plants of this type. The physico-chemical characteristics of the plant are presented. A high specific surface ($264\text{ m}^2/\text{g}$) and a high content of carboxylic groups ($0.95\text{ mmol}/\text{H}^+$) were found. Pb^{2+} hyperaccumulation was tested using a wide range of metal initial concentration (C_i) (0.8 ± 0.00 , 2.70 ± 0.03 , 4.70 ± 0.06 , 15.18 ± 0.55 and $28.40\pm 0.22\text{ mg Pb}^{2+}/\text{L}$) and exposure time (0.5, 2,4,6,8 and 24 h) in the presence and absence of some organic and inorganic compounds (propionic acid and magnesium sulfate). Based

on a compartmentalization analysis, a bioadsorption (BAF) and an intracellular accumulation factor (IAF) were proposed to obtain an indepth insight into the Pb^{2+} hyperaccumulation in *S. minima*. The main mechanism during such process was adsorption (BAF ranged from 780 to 1980) and according to the pseudo-second order adsorption model, chemisorption was predicted to play a major role. Surprisingly, it was found that Pb^{2+} was accumulated into the cells of the plant at a C_i as high as 28.40 ± 0.22 mg Pb^{2+}/L (IAF ranged from 5 to 1007). The intracellular accumulation of Pb^{2+} in *S. minima* seems to be described by Michaelis-Menten model.

Keywords: aquatic fern, heavy metals, phytoremediation, lagoons, hyperaccumulation.

CONTENIDO

Abreviaturas	13
1.INTRODUCCIÓN	15
1.1 Metales	15
1.2 Pb – un contaminante ambiental de nivel global	16
1.3 Toxicidad del Pb	18
1.4 Tecnologías convencionales para la eliminación de metales pesados del agua	20
1.5 Fitotecnologías para la eliminación de metales pesados del agua	21
1.6. Mecanismos de acumulación y tolerancia de metales en plantas	28
1.7 El género <i>Salvinia</i> y la acumulación de metales pesados	38
2. JUSTIFICACIÓN	44
3. OBJETIVOS	45
4. ESTRATEGIA GENERAL DEL TRABAJO	45
5. MATERIAL Y MÉTODOS	48
5.1 Caracterización de la biomasa de <i>Salvinia minima</i>	48
5.1.1 Preparación del inóculo y cuantificación de microalgas rizosféricas	48
5.1.2 Pre-tratamiento de la biomasa de <i>Salvinia minima</i>	50
5.1.3 Determinación de porcentaje de materia seca	51
5.1.4 Determinación de porcentaje de cenizas	51
5.1.5 Cuantificación del contenido de proteína	52

5.1.6 Cuantificación del contenido de lípidos	54
5.1.7 Determinación del contenido de carbohidratos	54
5.1.8 Determinación de la superficie específica	55
5.1.9 Cuantificación de acidez total	56
5.1.10 Cuantificación de acidez carboxílica	57
5.1.11 Cuantificación de grupos hidroxil fenólicos	58
5.2 <i>Evaluación de la hiperacumulación de Pb en Salvinia minima y de la cinética de la adsorción y acumulación intracelular</i>	58
5.2.1 <i>Estrategia experimental</i>	58
5.2.2 <i>Preparación del Inóculo</i>	59
5.2.3 <i>Unidades experimentales</i>	60
5.2.4 <i>Análisis de compartamentalización</i>	61
5.2.5 <i>Cuantificación de Pb en columna de agua</i>	63
5.2.6 <i>Lavado de biomasa y cuantificación de Pb en biomasa</i>	63
5.2.7 <i>Cinética de eliminación de Pb de la columna de agua</i>	64
5.2.8 <i>Factor de Bioconcentración (FBC), Factor de Adsorción (FAD) y Factor de Acumulación Intracelular (FAI)</i>	65
5.2.9 <i>Cinética de adsorción de Pb</i>	66
5.2.10 <i>Equilibrio de adsorción de Pb</i>	68
5.2.11 <i>Cinética de acumulación intracelular</i>	69
5.2.12 <i>Análisis estadístico</i>	70
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
6.1 <i>Caracterización de la biomasa de Salvinia minima</i>	70

<i>6.1.1 Cuantificación de microalgas rizosféricas</i>	70
<i>6.1.2 Características fisicoquímicas de <i>Salvinia minima</i></i>	72
<i>6.2 Evaluación de la hiperacumulación y de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de Pb en <i>Salvinia minima</i></i>	77
<i>6.2.1 Eliminación de Pb en la columna de agua en lagunas con <i>Salvinia minima</i></i>	77
<i>6.2.2 Análisis de compartimentalización de Pb en lagunas con <i>Salvinia minima</i></i>	83
<i>6.2.3 Evaluación del Factor de Bioconcentración (FBC), Factor de Adsorción (FAD) y Factor de Acumulación Intracelular (FAI)</i>	89
<i>6.2.4 Cinética y equilibrio de adsorción de Pb en <i>Salvinia minima</i></i>	98
<i>6.2.5 Acumulación intracelular de Pb en <i>Salvinia minima</i></i>	109
7. CONCLUSIONES	118
RECOMENDACIONES	119
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
ARTÍCULO PUBLICADO	
CAPÍTULO DE LIBRO PUBLICADO (REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA)	

Abreviaturas

bh	Base húmeda
bs	Base seca
NTK	Nitrógeno Total Kjeldahl
SE	Superficie específica
ARS	Agua Residual Sintética
AD	Agua desionizada
C_i	Concentración Inicial
k_1	Constante de velocidad de la cinética de primer orden (1/h)
t	Tiempo
k_2	Constante de velocidad de la cinética de segundo orden (L/mg h)
FBC	Factor de Bioconcentración
FAD	Factor de Adsorción
FAI	Factor de Acumulación Intracelular
q_t	Capacidad de adsorción (mg/g) al tiempo t (h)
q_e	Capacidad de adsorción (mg/g) en el equilibrio
k_1	Constante de velocidad de adsorción de primer orden (1/h)
k_2	Constante de velocidad de adsorción de segundo orden (g/ mg h)
t	Tiempo de contacto (h)
h	Velocidad inicial de adsorción (mg/g h)
q	Capacidad de adsorción (mg/g)
$q_{máx}$	Capacidad máxima de adsorción (mg/g)

b	Constante de Langmuir relacionada a la energía de adsorción (L/mg)
C_e	Concentración del metal en la fase líquida en el equilibrio (mg/L).
K	Constante de Freundlich relacionada a la capacidad de adsorción [(mg/g)(L/ mg) ^{1/n}]
n	Constante de Freundlich relacionada a la intensidad de adsorción
V	Velocidad de acumulación intracelular al tiempo t (mg Pb ²⁺ /g biomasa h)
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima de acumulación intracelular (mg Pb ²⁺ /g biomasa h)
K_m	Concentración de Pb ²⁺ a la cual la mitad de la velocidad máxima de acumulación intracelular del metal es obtenida (mg/L)
GSH	Glutati3n
FQ	Fitoquelatina
GSSG	Forma oxidada del GSH, disulfuro

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Metales

Se denomina metal a todos aquellos elementos químicos caracterizados por ser buenos conductores del calor y la electricidad, poseer alta densidad y ser sólidos a temperaturas ambiente (excepto el mercurio y el galio). Sus sales forman iones electropositivos (cationes) en disolución y algunas otras forman aniones (oxianiones). De acuerdo a su densidad se clasifican en ultraligeros ($<2 \text{ gm}^3$), ligeros ($<4.5 \text{ gcm}^3$) y pesados ($> 4.5 \text{ g cm}^3$). Del 90% de los elementos presentes en la corteza terrestre, el 80% son metales y el 60% son metales pesados. (Sharma y Dietz, 2006).

En las células vivas, se requieren iones metálicos esenciales para el metabolismo, tales como el Na^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , etc. Algunos otros (Fe^{2+} , $^{3+}$ Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mo^{4+} , $^{6+}$) son micronutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas; una vez que son incorporados en las enzimas y cofactores, ellos controlan procesos celulares particulares. Aunque también son esenciales, pueden llegar a ser tóxicos en concentraciones relativamente elevadas. El Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ag^{2+} son iones que no tienen alguna actividad biológica asociada y debido a que interactúan con los grupos SH de las proteínas y otras biomoléculas son extremadamente tóxicos a las células (Moreno-Sánchez *et al.*, 1999).

Una clasificación biológica relevante de los metales está basada en la química de enlaces de coordinación e incluye tres categorías: clase A con afinidad por los

ligandos que contienen oxígeno, clase B con afinidad por los ligandos que contienen nitrógeno o sulfuro y una clase intermedia. Esta última agrupa a aquellos metales con afinidad por los 3 grupos de ligandos con preferencias definidas. Esta caracterización refleja una manera general en la cual diferentes iones metálicos interactúan con sistemas biológicos. Los siguientes iones son ejemplos de iones tóxicos para las plantas: Al^{3+} , AsO^{-2} , AsO_3^{-4} , Au^+ , Cd^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , CrO_2^{-4} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , SeO_2^{-3} , SeO_2^{-4} , Sn^{2+} , W^{6+} y Zn^{2+} (Sharma y Dietz, 2006).

1.2 Plomo (Pb), un contaminante ambiental de nivel global

La contaminación ambiental por metales pesados en la biosfera es un tema de gran preocupación a escala local, regional y global. Ésta se ha acelerado dramáticamente desde el comienzo de la revolución industrial debido al rápido ritmo de la industrialización y urbanización. Muchos metales están categorizados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). El plomo, mercurio, arsénico y cadmio están clasificados como los de mayor riesgo en la lista de la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Estados Unidos (ATSDR) (Rai, 2008).

El Pb^{2+} es uno de los elementos tóxicos más abundantes y más ampliamente distribuidos en el medio ambiente por lo que está presente en suelo, agua, aire y biota. Éste, como contaminante inorgánico, ocurre como elemento natural en la

corteza terrestre o atmósfera, y también es liberado al ambiente debido a actividades humanas (Pilon-Smits, 2005). Desde tiempos antiguos, este metal comenzó a dispersarse en el ambiente por actividades mineras. Posteriormente, la revolución industrial estimuló en gran manera la explotación de la metalurgia del plomo pero su disposición segura fue descuidada hasta que los daños a la salud humana fueron demostrados. Actualmente, existen numerosas fuentes de dispersión de $Pb^{2+,4+}$ en el ambiente: fundición y pulimiento de plomo, pinturas, gasolina de automóviles, ruptura de baterías ácidas, plaguicidas, residuos mineros, lodos de aguas residuales y aplicaciones de excretas como fertilizante. Las principales fuentes de contaminación en las que se han centrado las preocupaciones para su control, son el polvo urbano en las ciudades, la fuga de Pb^{2+} en ríos y aguas subterráneas y la contaminación de la cadena alimenticia a través de cultivos contaminados con Pb^{2+} (Marmiroli *et al.*, 2005). En décadas recientes la liberación anual mundial de plomo alcanzó las 783,000 toneladas métricas (Padmavathiamma y Li, 2007), mientras que en algunas de las aguas residuales industriales, las concentraciones de Pb^{2+} alcanzan los 200-500 mg/L (Erenturk y Malkoc, 2007). En el caso de México, los valores máximos permisibles para descargas de aguas residuales, a diferentes cuerpos receptores, están especificados en la NOM-001-SEMARNAT-1996. En ella, la concentración máxima permisible de Pb^{2+} para la protección de vida acuática es 0.2 y 0.4 mg/L para promedio mensual y diario, respectivamente.

1.3 Toxicidad del Pb^{2+}

Debido a su alta solubilidad en ambientes acuáticos, los metales pesados pueden ser absorbidos por organismos vivos y entrar a la cadena alimenticia (Kurniawan *et al.*, 2006). La exposición a altos niveles de estos metales ha sido relacionada a efectos citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos en la salud humana y en la fauna y flora (Prasad *et al.*, 2003).

En el caso del Pb^{2+} , una vez que es absorbido por las plantas, causa múltiples efectos directos e indirectos sobre su crecimiento y metabolismo (Fig. 1). Sus efectos dependen de la concentración, tipo de sal, pH y las especies de plantas involucradas. Los efectos del Pb^{2+} son más pronunciados a altas concentraciones y a mayor tiempo de exposición. En contraste, este metal, en algunos casos es capaz de estimular procesos metabólicos aún a bajas concentraciones (de Almeida *et al.*, 2007). Además de sus efectos sobre la fotosíntesis, respiración y régimen de agua, el Pb^{2+} también provoca estrés oxidativo debido al incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Estas especies están reducidas parcialmente ó son derivados activos de oxígeno comprendiendo los radicales libres (O_2^- , $OH\cdot$, $OH_2\cdot$) y los que no lo son (H_2O_2) (Jaleel *et al.*, 2009).

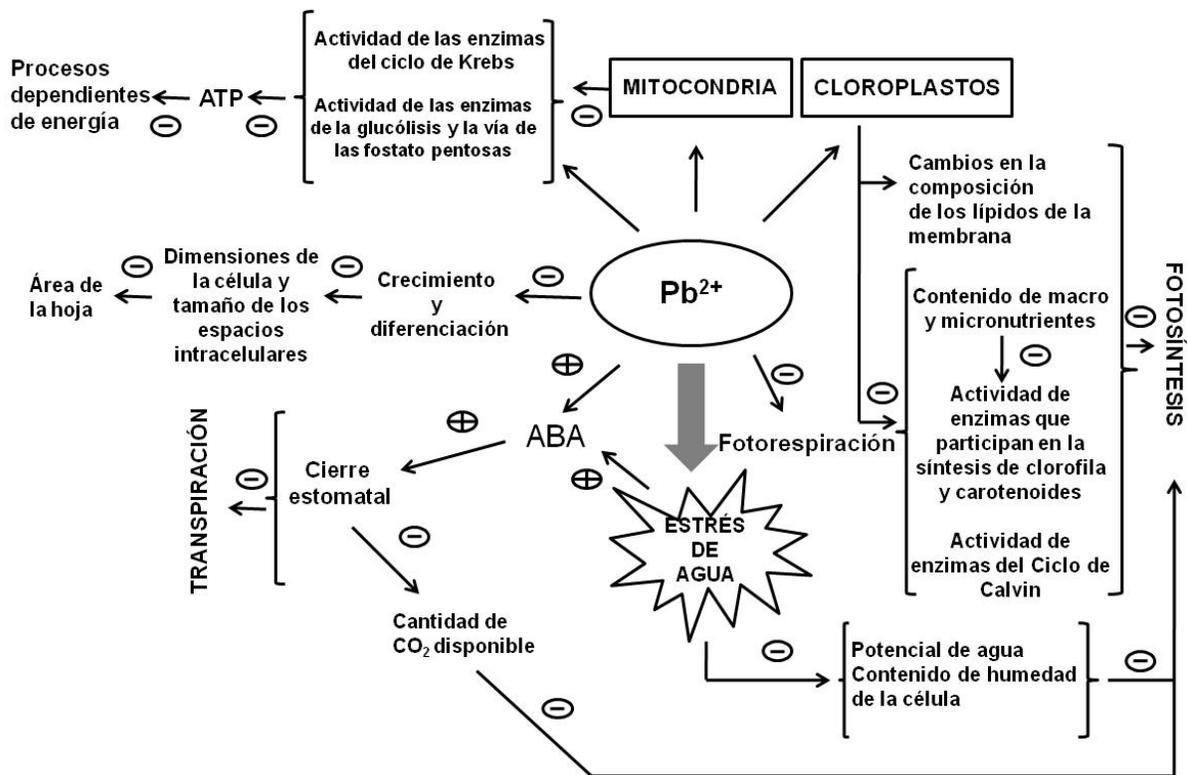


Figura 1. Efectos del Pb^{2+} sobre la fotosíntesis, respiración y régimen de agua en plantas (Modificado de Seregin e Ivanov, 2001).

En condiciones fisiológicas normales, las ERO son continuamente producidas como subproductos de los procesos metabólicos aerobios (fotosíntesis, respiración y fotorrespiración) pero son eliminadas por vías antioxidantes para mantener el crecimiento normal de la planta. Sin embargo, el aumento de las ERO resulta cuando la producción de éstas excede la capacidad de la célula para generar antioxidantes durante condiciones desfavorables tales como la presencia de metales pesados. Este exceso causa daño a las proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN y finalmente la muerte de la célula (Rao y Reddy, 2008).

1.4 Tecnologías convencionales para la eliminación de metales pesados del agua

La contaminación del agua por metales pesados es un tema de importancia económica y ambiental en numerosas partes del mundo. Después de cambios en la legislación y esfuerzos en la industria, el tratamiento de aguas residuales queda todavía como un reto económico para muchas compañías de tamaño medio, especialmente para aquellas que manejan aguas con una composición química extrema (i.e. alta fuerza iónica (i.e 50 mM sulfato), alta acidez (pH<3) o alto contenido en metales o metaloides específicos tales como Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , $As^{3+,5+}$, $Cr^{3+,6+}$ o Fe^{2+} (valores mayores a los establecidos en la normatividad para descargas de aguas residuales)(Kohler *et al.*, 2007). Por lo anterior, su eliminación de aguas contaminadas se ha convertido en un tópico de investigación muy importante en años recientes (Oliveira *et al.*, 2008).

Actualmente, la eliminación de metales pesados de aguas residuales está basada en procesos de origen fisicoquímico tales como adsorción, precipitación química, intercambio iónico, filtración con membranas, extracción con solventes, métodos oxidación/reducción, etc. Sin embargo, se han descrito diversas desventajas de este tipo de procesos: a) altos requerimientos de reactivos químicos y energía, b) altos costos de operación, b) uso de químicos no deseables para el ambiente, c) eficiencia específica para un único ión, d) eliminación incompleta del metal, e) poca efectividad para tratar un gran volumen de agua con baja concentración de metal (1-

100 mg/L) y f) generación de lodos tóxicos u otros residuos que requieren una disposición segura (Mallinck, 2003; Kurniawan *et al.*, 2006; Doshi *et al.*, 2008; Gadd, 2009).

Por lo anterior, se requieren procesos simples, efectivos, económicos y ambientalmente pertinentes para el tratamiento de las aguas residuales con metales pesados (Erenturk y Malkoc, 2007). En este contexto, los sistemas biológicos para la eliminación de metales de soluciones con baja concentración tienen el potencial para alcanzar altos rendimientos a un costo menor (Wang *et al.*, 1996; Gadd, 2009).

1.5 Fitotecnologías para la eliminación de metales pesados del agua

1.5.1 Fitorremediación

La fitorremediación se define como el uso de plantas y sus microorganismos asociados para eliminar, reducir, degradar o inmovilizar contaminantes ambientales del suelo y agua restaurando de esta manera sitios contaminados a un ambiente relativamente limpio y no tóxico. Ésta es una tecnología prometedora, rentable y ambientalmente pertinente por medio de la cual una gran variedad de aguas contaminadas pueden ser fitorremediadas incluyendo aguas negras, escurrimientos agrícolas, aguas residuales industriales, escurrimientos mineros, lixiviados de rellenos sanitarios y aguas subterráneas (Pilon-Smits, 2005; Pilon-Smits y Freeman, 2006).

La creciente aceptación de la fitorremediación está basada en parte en su relativo bajo costo en comparación a las tecnologías convencionales, debido principalmente a que se hace uso de la energía solar para la actividad remediadora. Otra ventaja es que tiene potencial para tratar una gama diversa de materiales tóxicos en concentraciones de bajas a moderadas. Asimismo, el hecho de que la fitorremediación sea llevada a cabo *in situ* también contribuye a su rentabilidad y a que puede reducir la exposición del sustrato contaminado a humanos, vida silvestre y al medio ambiente. Finalmente, tiene popularidad con el público en general por ser estéticamente placentera ya que es una alternativa de “limpieza verde” en comparación al tratamiento químico (Glass, 2000; Pilon-Smits, 2005).

A pesar de lo anterior, también tiene ciertas limitaciones tales como su restricción a sitios con concentraciones de contaminantes relativamente bajas; en algunos casos es más lenta que los métodos convencionales (especialmente la fitoremediación de suelos), puede ser no aplicable a todos los tipos de residuos y finalmente la biodisponibilidad de los contaminantes también puede representar una limitante (Glass, 2000; Eapen *et al.*, 2007).

1.5.2 Fitofiltración

La fitofiltración, una subcategoría de la fitorremediación, es el uso de plantas para eliminar contaminantes del agua y corrientes de agua. Se pueden considerar tres diferentes sistemas en esta forma de fitorremediación: a) rizofiltración b) humedales

construidos y c) sistemas basados en bioadsorbentes (Sánchez-Galván y Olguín, 2009).

a) Rizofiltración

En estos sistemas, la raíz de la planta absorbe, concentra y precipita los contaminantes presentes en las aguas residuales irrigadas, a través del sistema radicular y de las partes cosechables de los brotes superiores (Verma *et al.*, 2006). Una volatilización subsecuente de los contaminantes también puede ocurrir. A medida que la raíz y los brotes son saturados con los metales, las raíces o la planta completa es cosechada para su disposición final. La ventaja de usar plantas terrestres es que producen sistemas radiculares largos, abundantes y con frecuencia fibrosos con una gran superficie para la adsorción de contaminantes (Padmavathiamma y Li, 2007).

b) Humedales construidos

Estos han sido diseñados para tratar aguas residuales aprovechando los diversos procesos que ocurren en humedales naturales pero en un ambiente más controlado. Los procesos naturales involucran vegetación, suelo y sus microorganismos asociados (Vymazal, 2007). Tres diferentes subsistemas pueden ser clasificados dentro de los humedales: a) Lagunas con plantas acuáticas flotantes, b) humedales de flujo superficial y c) humedales de flujo sub-superficial (Olguín y Sánchez-Galván, 2010).

Los sistemas con plantas acuáticas flotantes consisten de una o más lagunas poco profundas en las cuales las plantas flotan en la superficie (Fig. 2). Diversas plantas de este tipo han sido probadas para purificar aguas residuales removiendo metales. Éstas van desde plantas mayores con escarpelas de hojas flotantes y raíces sumergidas bien desarrolladas (i.e. *Ipomoea aquatica*, *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*), hasta plantas de superficie diminuta que flotan con pocas o sin raíces (Lemnáceas, *Salvinia*, *Azolla*) (Vymazal y Kropfelová, 2008).

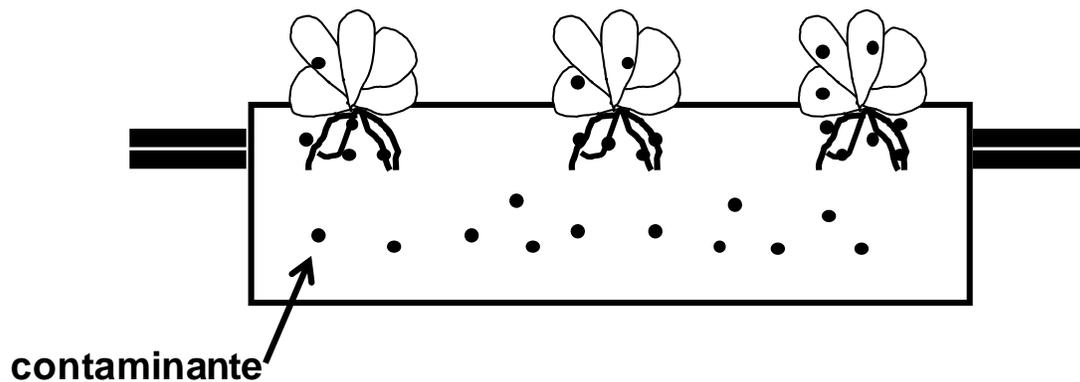


Figura 2. Lagunas con plantas acuáticas (Modificado de Sánchez-Galván y Olguín, 2009).

Por otro lado, los humedales de flujo superficial consisten en cuencas poco profundas o una secuencia de ellas que contienen de 20-30 cm de suelo con una profundidad de agua menor a 0.4 m. La vegetación emergente densa (*Phragmites australis*, *Typha domingensis*, etc.), cubre regularmente más del 50% de la superficie. Sin embargo, macrofitas sumergidas flotantes (i.e. *Potamogeton natans*, *Hydrilla sp. etc*) y aquellas de hojas flotantes y con raíces en el sedimento pueden

también estar presentes (Greenway,2007; Vymazal y Kropfelova, 2008). Los de flujo sub-superficial son canales, cuencas o zanjas llenas de grava, suelo o arena en los cuales está plantada vegetación emergente. El flujo puede ser horizontal o vertical. En el primer caso el agua residual fluye lentamente a través del lecho en forma más o menos horizontal y entra en contacto con una red de zonas aerobias, anoxicas y anaerobias. En los humedales verticales, el agua residual inunda la superficie y gradualmente filtra el lecho drenando libremente, lo que permite que el lecho se sature con aire (Vymazal y Kropfelová, 2008).

c) Sistemas basados en bioadsorbentes

La bioadsorción es una propiedad de los organismos en forma viable y no viable y puede definirse simplemente como la eliminación de sustancias de soluciones por material biológico (Gaad, 2009). Dicha eliminación se lleva a cabo por la unión pasiva o fisicoquímica de, especies químicas, a los biopolímeros de la superficie de la biomasa. La bioadsorción ha mostrado ser una biotecnología prometedora para la eliminación de metales de aguas residuales provenientes de actividades industriales, agrícolas y mineras (Gardea-Torresdey *et al.*, 2004). Diferentes macrofitas han sido utilizadas en forma no viable como bioadsorbentes de metales pesados, especialmente las plantas acuáticas flotantes del género *Salvinia*, *Azolla*, *Eichhornia*, *Lemna* y *Pistia* (Lloyd-Jones *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, 2005; Miretzky *et al.*, 2006; Mohanty *et al.*, 2006; Rakhshae *et al.*, 2006). Una de sus desventajas

consiste en la necesidad de preparación previa de la biomasa tal como el secado, tamizado (Sánchez-Galván y Olgúin, 2009) y en algunos casos la modificación química de la misma para lograr una mayor capacidad de adsorción (Tiemann *et al.*, 2002; Abbas *et al.*, 2008).

1.5.3 Mecanismos de eliminación de metales pesados en sistemas de fitofiltración

Diversos son los mecanismos a través de los cuales los metales son eliminados de las aguas residuales en los sistemas de fitofiltración descritos en la sección anterior (Fig.3). En los sistemas de rizofiltración, la absorción, adsorción, concentración y precipitación de metales ocurre en la raíz y partes cosechables aunque también ocurre la volatilización de los mismos (Verma *et al.*, 2006).

En el caso de las lagunas con plantas acuáticas flotantes, la eliminación de dichos contaminantes en sistemas por lote están primeramente en función de la presencia de ciertos nutrientes y ligandos con dependencia secundaria de condiciones ambientales (Olgúin *et al.*, 2005). Cuando la presencia de dichos nutrientes o ligandos no es determinante en la eliminación de los metales, ésta se realiza principalmente debido a la acumulación por las plantas (Wu *et al.*, 2008; John *et al.*, 2008). La adsorción a las raíces o a la superficie de la planta, la translocación y la

acumulación intracelular han sido descritos como los principales mecanismos involucrados en este tipo de sistemas (Liao *et al.*, 2004; Olgúin *et al.*, 2005).

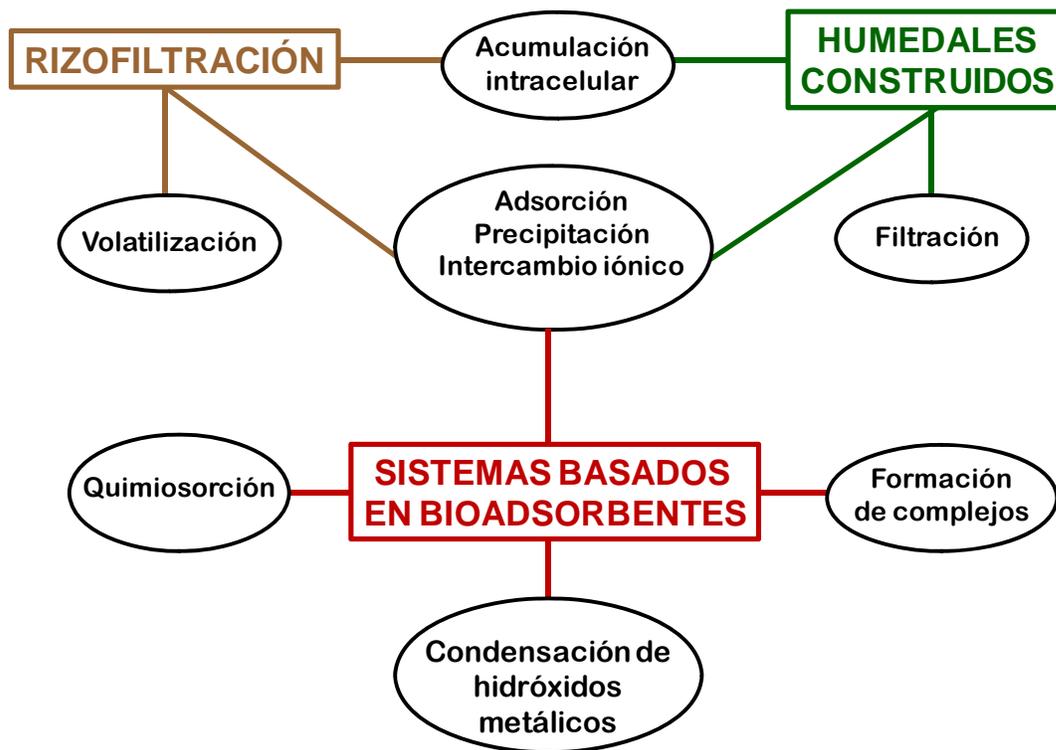


Figura 3. Mecanismos de eliminación de metales en sistemas de fitofiltración

En los sistemas en los que se tiene un sustrato o lecho, es decir en los humedales constructivos de flujo superficial y sub-superficial, los procesos a través de los cuales los metales son eliminados del agua son de origen físico-químico y biológico. Dentro de los primeros, se encuentran la filtración y precipitación química al contacto del agua con el soporte. También puede ocurrir por adsorción e intercambio iónico en la superficie de las plantas, soporte o sedimento. Finalmente, también los metales

pueden ser acumulados directamente por las plantas o los microorganismos presentes (EPA,2000; Greenway,2007).

En el caso de los sistemas basados en bioadsorbentes, el fenómeno de adsorción es complejo e incluye diferentes mecanismos de unión del metal con la biomasa tales como quimiosorción, formación de complejos, adsorción, intercambio iónico, microprecipitación, condensación, etc. (Gardea-Torresdey *et al.*, 2004;Demirbas, 2008).

1.6. Mecanismos de acumulación y tolerancia a metales en plantas

1.6.1 Acumulación e hiperacumulación

Para mantener la concentración de metales esenciales en límites fisiológicos y minimizar los efectos adversos de metales no esenciales, las plantas han desarrollado una red compleja de mecanismos homeostáticos que sirven para controlar la acumulación, tráfico y desintoxicación de metales. Los procesos de transporte, quelación y secuestro son los principales mecanismos de la homeostasis de metales (Clemens, 2001).

La acumulación de metales en las plantas inicia cuando se introducen en el simplasto de la raíz, una vez que han atravesado la membrana plasmática de las células endodermales de la raíz o pueden entrar en el apoplasto de la raíz a través de los

espacios entre las células. Si el metal es translocado a los tejidos aéreos, entonces, éste tiene que entrar al xilema y posteriormente el flujo de savia transportará el metal, donde es introducido en las células de la hoja. Una vez en el tejido del brote o de la hoja, los metales pueden ser almacenados en varios tipos de células dependiendo de las especies y de la forma del metal, ya que éste puede ser convertido en formas menos tóxicas (a la planta) a través de conversión química o formación de complejos, especialmente quelatos. El metal puede ser secuestrado y localizado en diversos compartimentos sub-celulares (pared celular, citosol, vacuola) o volatilizado a través del estoma (Peer *et al.*, 2000).

La acumulación de Pb^{2+} en plantas está regulada por parámetros fisicoquímicos tales como el pH del medio, presencia de exudados, la capacidad de intercambio catiónico de su superficie, etc. (Sharma y Dubey, 2005). Las plantas superiores o vasculares absorben y acumulan Pb^{2+} principalmente en las raíces y solamente una pequeña parte es translocada a la parte aérea (Patra *et al.*, 2004). Se ha descrito que la mayor parte del Pb^{2+} eliminado de una solución acuosa (57-77.5%), quedó en las raíces de *Eichhornia crassipes* cuando se expuso a varias concentraciones en el intervalo de 15-200 mg Pb^{2+} /L después de 14 días (Núñez *et al.*, 2009) La retención de Pb^{2+} en las raíces es debido a su unión, en la pared celular, a los sitios de intercambio iónico y a la precipitación extracelular, principalmente en la forma de carbonatos (Jarvis y Leung, 2002).

La hiperacumulación es una sub-clase de tolerancia a metales, en la cual altas concentraciones de metales y/o metaloides se encuentran en el tejido de las plantas (Baker y Whiting, 2002). Ésta ha sido reportada para elementos como Pb^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , $\text{Se}^{4+,6+}$ y $\text{As}^{3+,5+}$, entre otros (Meharg, 2005). Baker y Brooks (1989) definieron las concentraciones mínimas de metales que se deben encontrar en plantas terrestres y que no ocasionan toxicidad, para que dichas plantas sean consideradas como hiperacumuladores: 100 $\mu\text{g/g}$ para Cd^{2+} , 1,000 $\mu\text{g/g}$ para Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , y 10,000 $\mu\text{g/g}$ para Zn^{2+} y Mn^{2+} . Estos niveles están a una concentración de un orden de magnitud mayor a aquellas encontradas en especies no acumuladoras (Peer *et al.*, 2000).

En el caso de plantas acuáticas, Zayed *et al.* (1998) propusieron dos criterios para definir a las plantas acuáticas como hiperacumuladoras de metales y son a) una concentración del metal en el tejido mayor que 0.5% del peso seco de la planta y b) una factor de bioconcentración (FBC) mayor a 1000. Este factor se define como la relación entre la cantidad de metal encontrado en la biomasa (mg/Kg) y la concentración inicial del metal en la columna de agua (mg/L).

La acumulación e hiperacumulación de metales por plantas involucra diferentes mecanismos como a continuación se describe.

1.6.2. Exclución y tolerancia a metales pesados

Se han descrito diversas estrategias o mecanismos a través de las cuales las plantas interactúan con los metales, especialmente un “exceso” de ellos, para evitar o disminuir sus efectos tóxicos. En general, se pueden agrupar en estrategias de exclusión y estrategias de tolerancia. En las primeras, la acumulación del metal dentro de las células es restringida mientras que en las segundas, el crecimiento de la planta no se interrumpe aun en presencia de un exceso de metales (Moreno-Sánchez *et al.*, 1999; Regvar y Vogel-Mikus, 2008) (Fig.4).

a) Unión a la pared celular (Adsorción)

La adsorción se define como la unión física o química de iones o moléculas a una superficie (McMurry, 2003) y es el principal mecanismo responsable de la acumulación de metales en plantas acuáticas. En ésta, los iones metálicos son secuestrados de la solución a través de diversos procesos tales como: Quimiosorción, formación de complejos, intercambio iónico, adsorción-complejación sobre la superficie y poros, adsorción a la superficie, microprecipitación y condensación de hidróxidos de metales en la superficie (Stirk y Staden, 2001; Gardea-Torresdey *et al.*, 2004; Demirbas, 2008).

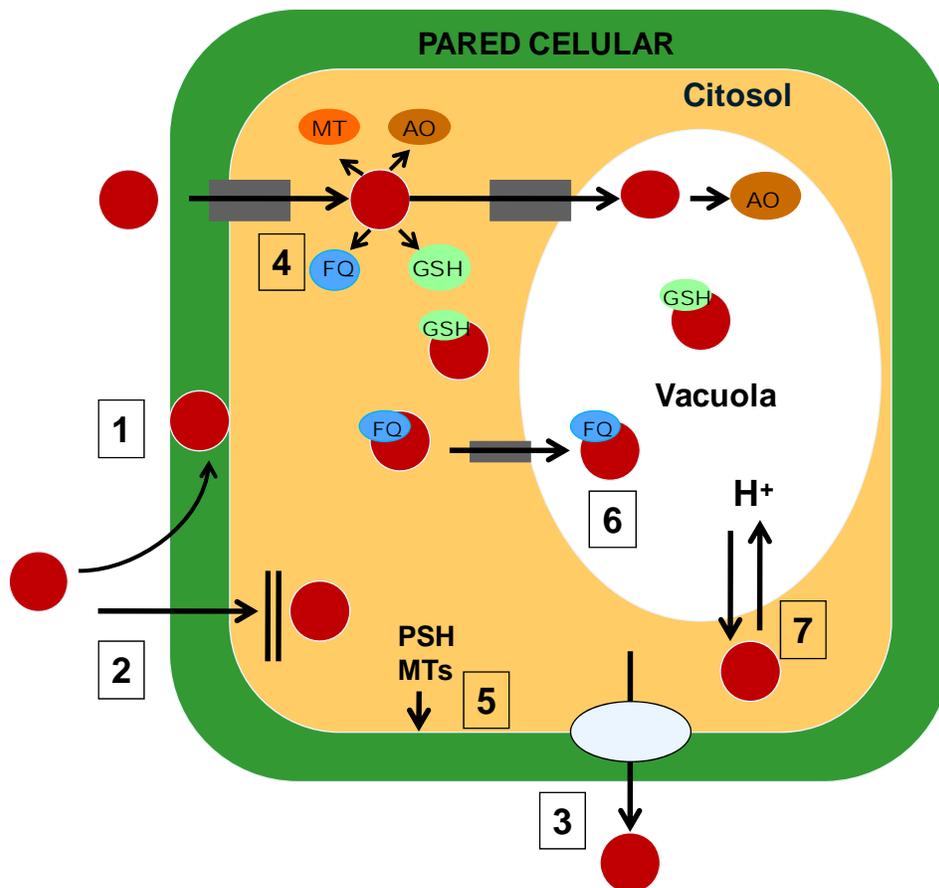


Figura 4. Mecanismos de exclusión y tolerancia a metales pesados en células vegetales: 1. Unión a la pared celular 2. Acumulación reducida a través de la membrana plasmática 3. Eflujo activo 4. Quelación del metal en el citosol por varios ligandos 5. Reparación y protección de la membrana plasmática bajo condiciones de estrés 6. Transporte del complejo FQ-Metal a la vacuola 7. Compartimentalización de metales en la vacuola. MT: metalotioneínas, AO: ácidos orgánicos, FQ: fitoquelatinas, GSH: glutati6n. (Hall, 2002; Yang *et al.*, 2005; Pilon-Smits, 2005).

La adsorción ha sido mayormente estudiada en biomasa no viable de plantas evaluando la cinética y el equilibrio de la misma y la influencia del pH, del contenido de compuestos enlazantes de metales y la concentración inicial del metal sobre la capacidad de adsorción de plantas acuáticas tales como *Potamogeton lucens*

(Schneider *et al.*, 1999; Lacher y Smith, 2002), *Salvinia natans* (Mukherjee *et al.*, 2005), *Azolla filiculoides* (Lloyd-Jones *et al.*, 2004), *Lemna minor* (Saygideger *et al.*, 2005), *Salvinia minima* (Sánchez-Galván *et al.*, 2006). etc. Poco se ha descrito respecto a la adsorción que ocurre en biomasa vegetal viable. En este sentido, *Myriophyllum spicatum* ha sido una de las pocas especies estudiadas (Keskinkan *et al.*, 2003; Lesage *et al.*, 2007).

b) Disminución en la velocidad de acumulación a través de la membrana plasmática

El número de ejemplos de reducción en la velocidad de acumulación de metales/metaloides en plantas es limitado. En raíces de *Holcus lanatus*, el fosfato y arsenato parecen ser acumulados por los mismos sistemas. Un genotipo que es tolerante a As mostró una velocidad más baja de acumulación para ambos aniones que el genotipo no tolerante. El sistema de acumulación de fosfatos y arsenato fue genéticamente correlacionado con tolerancia a arsenato (Meharg y Macnair, 1992).

c) Flujo activo de metales desde el citoplasma

Existen proteínas transportadoras que están involucradas en el flujo de metales desde el citoplasma, ya sea para el movimiento de ellos a través de la membrana plasmática o al interior de los organelos, incluyendo la familia de las P1B-ATPase y la del facilitador de difusión de cationes. Ellas juegan un papel significativo en la desintoxicación y tolerancia por compartimentalizar los metales o por introducirlos en la raíz o en el apoplasto del brote (Regvar y Vogel-Mikus, 2008).

d) Quelación

La quelación de metales en el citosol por ligandos es un mecanismo muy importante de la detoxificación y tolerancia a metales pesados. Los ligandos potenciales incluyen aminoácidos y ácidos orgánicos (AO) y dos clases de péptidos, las fitoquelatinas (FQs) y las metalotioneínas (MTs) (Hall, 2002).

Fitoquelatinas (FQs)

Las fitoquelatinas (FQs) son pequeños péptidos compuestos de solamente tres aminoácidos, glutatión, cisteína y glicina; los residuos de glutatión y cisteína están unidos a través de un enlace γ -carboximida. Las FQs son sintetizadas a partir de glutatión reducido (GSH) en una reacción de transpeptidación (Clemens, 2001). *In vitro*, la fitoquelatina sintasa purificada parcialmente es activa únicamente en la presencia de iones metálicos. El mejor activador de la FQ sintasa es Cd^{2+} seguido de Ag^{2+} , Bi^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} y Au^{2+} . La biosíntesis de FQs continúa hasta que el ión metálico activado es quelado por las FQs formadas o por la adición de un quelante del metal tal como el EDTA (Sriprang y Murooka, 2007).

Metalotioneínas (MTs)

Las metalotioneínas son proteínas ubicuas ricas en cisteína y de bajo peso molecular, las cuales ligan iones metálicos en grupos tiolato-metales (Clemens, 2001). Su papel biológico se enfoca en la formación de enlaces con iones metálicos pesados para evitar que interactúen con otros componentes celulares, además de la

regulación homeostática de iones metálicos esenciales (Sriprang y Murooka, 2007). En plantas, la expresión del gen para la síntesis de MTs es inducida en respuesta al estrés por metales pesados tales como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} y Pb^{2+} (Kagi, 1991; Cobbett y Goldsbrough, 2002).

Aminoácidos y ácidos orgánicos

Las plantas producen una amplia variedad de ligandos para metales. Los ácidos carboxílicos y aminoácidos son ligandos potenciales para metales pesados debido a la reactividad de éstos con S, N y O, por lo que podrían tener un papel importante en la tolerancia y desintoxicación de metales (Rauser 1999; Clemens 2001; Hall 2002).

Este tipo de ligandos ha sido principalmente reportado en plantas terrestres. Los complejos de citrato de cadmio y zinc son prevalentes en hojas aun cuando el malato es más abundante. En la savia del xilema que se mueve de las raíces a las hojas, el citrato y la histidina son los principales ligandos para Cu^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} (Yang *et al.*, 2005).

e) Reparación y protección de la membrana plasmática bajo condiciones de estrés

La membrana plasmática puede ser referida como la primera estructura “viva” que es objetivo o blanco de la toxicidad por metales pesados. Su función puede ser rápidamente afectada por metales pesados por un escape incrementado de solutos de las células en la presencia de altas concentraciones de metales. Tal daño podría

resultar de varios mecanismos incluyendo la oxidación de los tioles proteicos, inhibición de proteínas de membrana claves tales como la H⁺-ATPasa, o cambios a la composición y fluidez de los lípidos de la membrana. Por lo anterior, es factible pensar que la tolerancia puede estar involucrada en la protección de la integridad de la membrana plasmática contra el daño por metales pesados (Hall, 2002).

Otro factor que podría estar involucrado en el mantenimiento de dicha membrana podría ser su reparación acelerada después del daño. Esto podría involucrar proteínas de impacto o choque de calor o MT. Dichas proteínas de forma característica muestran una expresión incrementada en respuesta al crecimiento de una variedad de organismos a temperaturas arriba de su temperatura de crecimiento. Ellas son encontradas en todos los grupos de organismos vivos y pueden ser clasificadas de acuerdo a su peso molecular y ahora se sabe que son expresadas en respuesta a una variedad de condiciones de estrés incluyendo estrés por metales pesados tales como aquellas generadas en las raíces de *Armeria maritime* crecida en suelos ricos en Cd (Yang *et al.*, 2005).

f) Transporte a la vacuola de los complejos FQs-Me y compartimentalización de Me en vacuola.

El transporte de metales a la vacuola es una de las vías más importantes para reducir los niveles de metales tóxicos en el citosol y por lo tanto para la tolerancia a

metales pesados. Hay evidencia que los complejos FQ-Me son transportados a la vacuola de plantas tales como el complejo Cd-FQs en *Brassica juncea* (Speiser et al., 1992). La compartimentalización de metales en la vacuola es también parte de los mecanismos de tolerancia de algunos hiperacumuladores de Me. *Thlaspi goesingense* es un hiperacumulador de Ni^{2+} que aumenta su tolerancia a este metal al compartimentalizarlo en su mayoría al interior de la vacuola. El alto nivel de expresión del transportador de iones metálicos a la vacuola TgMTP1 en dicha especie ha sido propuesto como el responsable de su gran habilidad para acumular iones metálicos en las vacuolas de sus brotes (Tong et al., 2004).

1.6.3 El papel de los antioxidantes en la tolerancia a metales pesados

Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que el Pb^{2+} genera estrés oxidativo. Las células de las plantas han desarrollado un sistema antioxidante para contrarrestar los efectos adversos causados por las especies reactivas de oxígeno (ERO). Dicho sistema comprende dos principales mecanismos de defensa, el no enzimático y el enzimático. El primero consiste de pequeñas moléculas tales como vitaminas (A,C y E), glutatión y compuestos fenólicos, los cuales son reductores solubles en agua y los carotenoides que serían los antioxidantes asociados a la membrana lipo-soluble. Todos estos pueden reaccionar directamente con las ERO para eliminarlas. El segundo mecanismo está representado por enzimas tales como superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa las cuales tienen la capacidad de eliminar el superóxido y el peróxido de hidrógeno (Jaleel et al., 2009). El GSH es un

metabolito multifuncional el cual está presente en concentraciones milimolares en varios tejidos de plantas (Creissen *et al.*, 1999, Meyer y Fricker, 2002, Noctor *et al.* 2002). Tiene un potencial de oxido-reducción de -0.23V que le permite actuar como un efectivo aceptor y donador de electrones para numerosas reacciones biológicas (Rao y Reddy, 2008). En este proceso antioxidativo, el GSH está involucrado de forma directa e indirecta y su papel de protección y de regulación está basado en los cambios en su estado redox, el cual es definido por su capacidad reductora y el potencial de la dupla glutatión/disulfuro (GSH/GSSG). Como componente de la ruta de GSH-ascorbato, el GSH toma parte en la eliminación del exceso de H₂O₂ en una reacción en la cual el GSH es oxidado a glutatión disulfuro (GSSG). La alta relación GSH/GSSG que ocurre bajo condiciones normales de crecimiento, puede ser restaurada por medio de una mayor actividad de la glutatión reductasa (GR), síntesis incrementada de GSH o un decremento en la degradación de GSH (Szalai *et al.*, 2009).

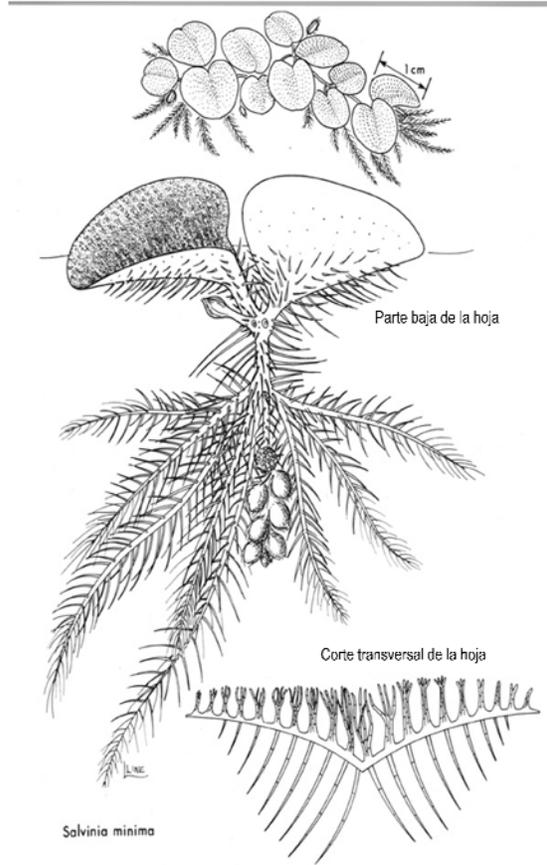
1.7 El género *Salvinia* y la acumulación de metales pesados

1.7.1 *Salvinia minima*

Salvinia, es uno de los dos géneros de la familia de las Salviniaceae. *S. minima* Baker es un pequeño helecho de agua fresca ampliamente distribuido en regiones tropicales y templadas del mundo. Bajo condiciones ambientales favorables, *Salvinia* se propaga por reproducción vegetativa y es capaz de colonizar grandes áreas de

agua en un corto periodo de tiempo (Al-Hamdani y Ballow, 2008). No tiene raíces verdaderas y cuenta con ramilletes de rizomas horizontales que flotan justo debajo de la superficie del agua y produce, en cada nodo, dos frondas emergentes y una tercera sumergida que está disectada en filamentos (Fig. 5). Las hojas pueden ser desde orbiculares hasta ovaes con una longitud de 0.4 a 2.0 cm. Cuando éstas crecen bajo intenso sol son más largas y elongadas y con frecuencia cambian de color verde esmeralda a café óxido cuando están maduras y en senectud. La parte superior de las frondas está uniformemente cubierta con filas de tricomas blancos y espinosos repelentes al agua mientras que en la parte inferior son de color castaño. Normalmente habita aguas estancadas poco profundas de pantanos, lagos y lagunas, zanjas, corrientes de flujo lento, etc. (Jacono, 2003).

(a)



(b)

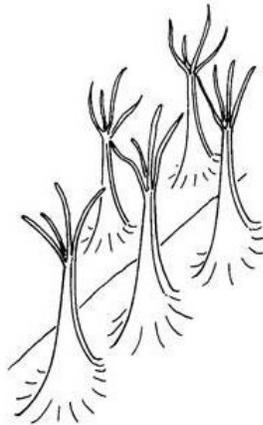


Figura 5. Aspectos morfológicos de *S. minima* (a) y estructura de los tricomas de las hojas (b) (Jacono, 2003).

1.7.2 Acumulación de metales pesados en el género *Salvinia*

Las macrofitas acuáticas, han sido seleccionadas para realizar estudios toxicológicos, ecológicos y de tratamiento de efluentes conteniendo metales pesados, dada su amplia distribución geográfica, su alta productividad y su tolerancia a ambientes extremos. El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) y las lemnáceas han sido las más estudiadas (Olguín *et al.*, 1994). Más recientemente, el género *Salvinia* ha sido investigado desde diversos aspectos. A continuación se resumen los trabajos más relevantes.

Sen y Mondal (1987,1990) reportaron que *Salvinia natans* fue capaz de eliminar hasta un 90 % de Hg^{+2} y Cu^{2+} en soluciones con concentraciones iniciales menores a 5 mg L^{-1} y máximas de 50 mgL^{-1} , respectivamente. También se ha mostrado que el crecimiento de *Salvinia molesta* se detiene a concentraciones subletales de Cd^{2+} (0.05 a 0.075 mgL^{-1}) utilizando 42 hojas por unidad experimental (Gupta y Devi, 1992). En el caso de *S.minima* los efectos tóxicos ocurrieron cuando fue expuesta a $20\mu\text{M}$ de Pb^{2+} y a $100\mu\text{M}$ de AsO_4^{3-} usando una densidad de 30 hojas y 15 pseudoraíces en 150 ml de medio Hoagland (Hoffman *et al.*, 2004). Otros iones como el Al^{3+} (10 y 20 mgL^{-1}), también inhibieron el crecimiento de *Salvinia* sp y redujeron las concentraciones de clorofila a y b y carotenoides. Sin embargo, cuando se adicionaron sustancias húmicas, extraídas de *Typha latifolia*, tales efectos fueron disminuidos (Gardner y Al-Hamdani, 1997). Por otro lado, cuando *S.minima* fue

expuesta a Cr^{6+} en concentraciones de 1 a 2 mg/L, los efectos tóxicos se reflejaron en un mayor contenido de azúcares solubles, almidón y carbohidratos totales no estructurales (Nichols et al., 2000).

También ha sido demostrado que *S. minima* tiene el potencial para remediar Cu^{2+} en concentraciones 100 veces más de la encontrada actualmente en ambientes de agua fresca. Sin embargo, también se demostró su sensibilidad a Cu^{2+} ya que después de 7 días de exposición su crecimiento decreció gradualmente al incrementar la concentración de Cu^{2+} a 3.0 mg/L. Después de 14 días, decreció la asimilación de CO_2 y la producción de pigmentos fotosintéticos (Al-Hamdani y Blair, 2004).

La capacidad de *S. herzogii* para eliminar Cr^{3+} a concentraciones desde 1 hasta 6 mg/L también ha sido estudiada. Maine et al. (2004) reportaron que la velocidad de acumulación fue directamente proporcional a la concentración inicial del metal en el agua. La acumulación de Cr^{3+} en las raíces fue rápida y se completó en las primeras 24 h (6.2 mg/g base seca), pero no fue traslocado ya que el metal encontrado en las frondas (0.44 mg/g base seca) fue consecuencia principalmente del contacto directo entre las hojas y la solución.

Por otro lado, Olgúin *et al.*, (2002) investigaron la capacidad de *S. minima* para bioacumular Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr^{6+} evaluando el efecto del pH y la intensidad de luz en sistemas por lote. Se describió por primera vez que *S. minima* es hiperacumuladora

de Cd ya que en todos los casos el FBC fue >2000 y el porcentaje de Pb en la biomasa fue 1.1%. La eliminación de Cr^{6+} fue muy limitada. Posteriormente se evaluaron los efectos de los factores ambientales y nutrientes sobre los posibles mecanismos de eliminación y la distribución de Pb^{2+} entre los compartimentos (biomasa, columna de agua y sedimentos) en lagunas con *S. minima* operadas por lote (Olguín *et al.*, 2005). La adsorción a la superficie de la biomasa fue el mecanismo de eliminación predominante en un medio sin la presencia de EDTA y fosfatos a concentraciones tan altas como 13 mg Pb^{2+} /L. Bajo tales condiciones se obtuvieron FBC de 2065 ± 35 y un contenido de Pb^{2+} en la biomasa de 2.7%, lo que permitió establecer que *S. minima* también es hiperacumuladora de Pb^{2+} . Se concluyó que los mecanismos de eliminación de Pb^{2+} por esta planta y la compartimentalización del mismo en el microcosmos de lagunas operadas por lotes están primeramente en función de la presencia de ciertos nutrientes y ligandos con una dependencia secundaria en las condiciones ambientales. Además, los resultados indican que el porcentaje de eliminación es únicamente un parámetro grueso y que el uso complementario del FBC y de un análisis de compartimentalización es necesario para obtener un entendimiento más claro del proceso de eliminación de metales.

En relación a los mecanismos de tolerancia y acumulación de metales, se ha reportado la inducción de tioles y FQs en frondas hijas cuando las frondas padres de *S. minima* fueron expuestas a 50 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ /L (Outridge *et al.*, 1991). Asimismo, Estrella-Gómez *et al.* (2009) encontraron que la acumulación intracelular de Pb^{2+} en

S. minima indujo cambios en la expresión del gen *SmPCS* en frondas y raíz, e incrementó la actividad de la fitoquelatina sintasa y la producción de FQs (2, 3 and especialmente 4), más notoriamente en raíces, después de 12 h de exposición a $40\mu\text{MPb}(\text{NO}_3)_2$ (8.316 mg Pb/L).

2. JUSTIFICACIÓN

El Pb está presente en aguas residuales de diverso origen. En la mayoría de los casos, el metal es descargado al medio sin un tratamiento adecuado. El contaminante puede ser transportado en los cuerpos de agua y llegar a ser una amenaza para los seres vivos debido a su toxicidad, acumulación en cadenas tróficas y persistencia en la naturaleza. La fitorremediación es una tecnología ambientalmente pertinente para el tratamiento de aguas residuales. Dentro de este contexto, los sistemas con plantas acuáticas han demostrado una alta capacidad de eliminar metales. En estudios previos de nuestro grupo de trabajo se encontró que el Cd y Pb son eliminados eficientemente en sistemas de lagunas operadas por lote con *S.minima* usando concentraciones iniciales del metal hasta de 3 mg/L (Olguín et al., 2002). Asimismo, se ha descrito que la planta hiperacumula Pb y que la adsorción y la acumulación intracelular son los principales mecanismos de eliminación de Pb en sistemas con *S.minima* en ausencia de nutrientes (EDTA y fosfatos) (Olguín et al., 2005). Sin embargo, es necesaria más información para entender los mecanismos involucrados en la hiperacumulación del metal lo que permitirá aprovechar los procesos participantes en la acumulación y transporte de

metales para coadyuvar en la optimización de las fitotecnologías para el tratamiento de efluentes que utilizan plantas hiperacumuladoras.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Estudiar la hiperacumulación de Pb^{2+} en *Salvinia minima* a través de la cinética de adsorción y acumulación intracelular.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Realizar la caracterización fisicoquímica de *S.minima*
- 2) Determinar y evaluar la hiperacumulación de Pb^{2+} en *S. minima* a diferentes:
 - ❖ Concentraciones iniciales de Pb^{2+} en la columna de agua
 - ❖ Tiempos de exposición y en
 - ❖ Presencia de sustancias orgánicas e inorgánicas
- 3) Investigar la cinética de la adsorción y de la acumulación intracelular de Pb^{2+} en *S. minima*

4. ESTRATEGIA GENERAL DEL TRABAJO

La estrategia general de trabajo se muestra en la Figura 6. Se utilizó *S.minima* cultivada en condiciones controladas de luz y temperatura. Primero se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de la biomasa para entender, en parte, el mecanismo

de adsorción de Pb^{2+} a la superficie. Posteriormente se obtuvo información sobre el efecto de algunos factores importantes que afectan la acumulación de metales en plantas. Se evaluó la influencia de la concentración inicial del metal (C_i) en la columna de agua; del tiempo en el cual la planta se expuso a dicho contaminante (T_e) y también el efecto de la presencia de sustancias orgánicas e inorgánicas. Se probaron cinco diferentes C_i para conocer si *S. minima* era capaz de hiperacumular Pb^{2+} en un amplio intervalo de concentraciones a diferentes tiempos de exposición, dada la diferente naturaleza entre la adsorción y la acumulación intracelular. Las sustancias inorgánicas y orgánicas probadas fueron sulfato de magnesio y ácido propiónico. El primero forma parte del medio sintético Hutner mod 1/10 en el cual se cultiva la planta, además de que el sulfato se ha encontrado en ciertas aguas residuales industriales conteniendo Pb. Además, todos los aspectos relacionados a iones que compiten por el transporte hacia el interior de la célula, tal como el caso del Ca^{2+} y Mg^{2+} , permiten inferir mecanismos de transporte aún no bien definidos. El ácido propiónico fue previamente incluido en un agua residual sintética en la que se evaluó la compartimentalización de Pb^{2+} en lagunas con *S. minima* evaluando el efecto de las condiciones ambientales (Olguín *et al.*, 2005). En cada tiempo de exposición se llevó a cabo un análisis de compartimentalización para conocer la distribución del Pb^{2+} en las lagunas y en la biomasa y se evaluó la capacidad hiperacumuladora de Pb^{2+} a partir del factor de bioconcentración (FBC) y de dos factores novedosos, el factor de adsorción (FAD) y el factor de acumulación intracelular (FAI). También se evaluó la cinética de la adsorción y la acumulación

intracelular de Pb^{2+} en *S. minima* para poder inferir los mecanismos específicos de adsorción y acumulación intracelular de Pb^{2+} participantes.

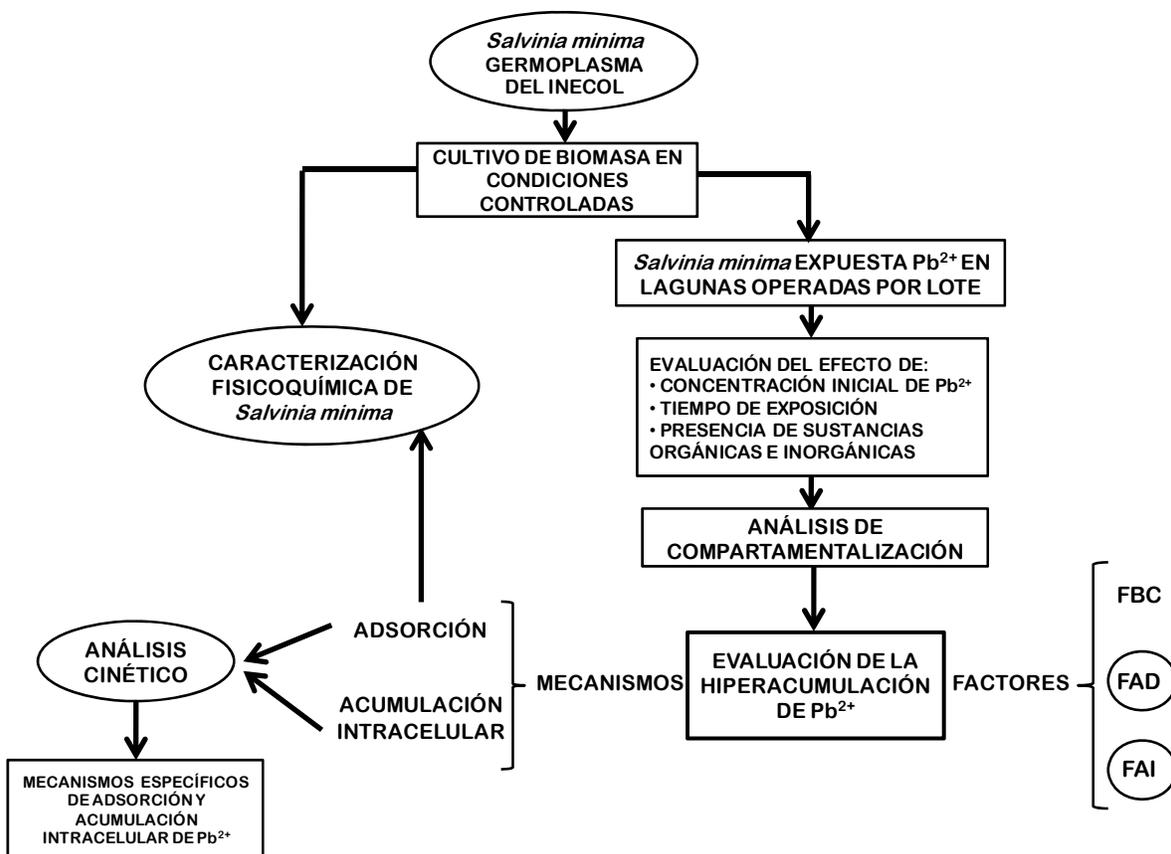


Figura 6. Estrategia general del trabajo

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Caracterización de la biomasa de *S.minima*

5.1.1 Preparación del inóculo y cuantificación de microalgas rizosféricas

S.minima, de la colección de germoplasma de la Unidad de Biotecnología Ambiental del Instituto de Ecología (Fig. 7), fue cultivada y mantenida como monocultivo en medio sintético Hutner modificado 1/10 a pH 6.0 (Tabla 1). Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25°C. La intensidad luminosa ($116 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 25°C) fue provista por lámparas de luz de día (Philips, 39W) operando en ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas.



Figura 7. Cultivo de *S.minima* en condiciones controladas (obtenida del Jardín Botánico del Inecol).

Tabla 1. Composición del medio sintético Hutner modificado 1/10 (Vermat y Hanif, 1998).

Nutriente	mg/L
NH ₄ NO ₃	20
K ₂ HPO ₄	40
MgSO ₄ .7 H ₂ O	50
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2.5
MnSO ₄ .H ₂ O	1.5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	6.5
H ₃ BO ₃	1.5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2.5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.4
CoSO ₄ .7H ₂ O	0.1
Na ₂ -EDTA. 2H ₂ O	50
CaCl ₂ . 2H ₂ O	16.2

La biomasa se lavó durante 5 minutos bajo la corriente de agua con el propósito de disminuir la presencia de microalgas rizosféricas unidas a la superficie de *S.minima*. La cantidad de microalgas remanente fue calculada cuantificando el contenido de clorofila de las microalgas presentes en 26.37 g húmedos (bh) de biomasa lavada. Ésta fue agitada durante 1 h en 600 ml de agua destilada y posteriormente se

transfirió a un contenedor de plástico conteniendo 900 ml de agua destilada y fue homogeneizada con un agitador magnético durante 5 min. La biomasa entonces fue eliminada y se tomaron alícuotas de 2 ml que se filtraron con papel filtro whatman (20-25µm) para la extracción de clorofila usando 5 ml de metanol. Después de 24 h, las muestras fueron centrifugadas a 3200 rpm durante 10 min y la absorción del sobrenadante se determinó a 665 y 750 nm. El contenido de clorofila se calculó usando la siguiente fórmula (Holm-Hansen y Riemann, 1978):

$$\text{Chl-a } (\mu\text{g l}^{-1}) = [(\text{Abs } 665\text{nm} - \text{Abs } 750\text{nm}) A V_m] / V_s L$$

Donde:

A: coeficiente de absorbancia de clorofila-a en metanol (12.63)

V_m : volumen de metanol usado para la extracción (ml)

V_s : litros de agua filtrada

L: longitud de la celda

5.1.2 Pre-tratamiento de la biomasa de *S.minima*

La biomasa de *S.minima*, cultivada durante 7 días bajo las condiciones descritas anteriormente, se retiró del medio, se lavó y se dejó escurrir durante 15 min sobre papel filtro para retirar el exceso de agua. Parte de esta biomasa se utilizó directamente para las determinaciones de materia seca, cenizas, proteína y lípidos. Otra parte de la biomasa se secó a temperatura ambiente, se molió en un mortero y

se le determinó el contenido de acidez carboxílica, acidez total e hidroxifenólica. Finalmente, otra parte se secó a 60°C, se molió en mortero y se cuantificó el contenido de carbohidratos y se determinó la superficie específica.

5.1.3 Determinación de porcentaje de materia seca (AOAC, 1990)

El porcentaje de materia seca se obtuvo a través de la pérdida gravimétrica de agua por calentamiento a 105°C hasta peso constante. Esta determinación se usó para corregir la concentración de un elemento en la biomasa de *S. minima* a una base de materia seca absoluta. Dicho porcentaje se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Materia seca} = [1 - (A - B) / (A - C)] \times 100$$

Donde:

A: peso de la cápsula más la muestra húmeda

B: peso de la cápsula más la muestra seca

C. peso de la cápsula

5.1.4 Determinación de porcentaje de cenizas (AOAC, 1990)

Una muestra de *S. minima* secada a 105°C fue calcinada a una temperatura de 550°C durante 8 horas. El porcentaje de cenizas se calculó con la siguiente expresión:

$$\% \text{ Cenizas} = 1 - (A - B) / (A - C) \times 100$$

Donde:

A: peso de la cápsula más la muestra seca

B: peso de la cápsula más la muestra calcinada

C. peso de la cápsula

5.1.5 Determinación del contenido de proteína (Determinado mediante el contenido de Nitrógeno Total Kjeldahl. Método micro Kjeldahl, Furman 1975).

El contenido de nitrógeno total Kjeldahl se cuantificó basado en la descomposición de compuestos conteniendo nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico y la posterior destilación del sulfato de amonio en un medio alcalino. 0.5 g de muestra se digirieron con 0.80g de K_2SO_4 , 1 ml de H_2SO_4 concentrado y 1ml de $CuSO_4$ al 4% p/v. La destilación se realizó en presencia de 5ml de NaOH 1:1p/v, mientras el destilado se recibió en H_3BO_3 al 4% p/v y se tituló con H_2SO_4 0.1N.

El porcentaje de nitrógeno se calculó con la expresión:

$$NTK = (V) (N) (0.014) / P (100)$$

Donde:

V=Volumen de H_2SO_4 empleado en la Titulación (ml)

N=Normalidad exacta del H_2SO_4

P=Peso de la muestra (g)

0.014=peso mili-equivalente del N

El porcentaje de Proteína se calculó con la expresión:

% Proteína (base seca) = % NTK (base seca) x 6.25 (AOAC, 1990).

5.1.6 Cuantificación del contenido de lípidos

Extracción de lípidos (Christie, 1993; Nichols, 1963).

Los lípidos de material vegetal y tejidos fotosintéticos son especialmente sensibles de sufrir una hidrólisis extensa por lipasas. Éstas hidrolizan rápidamente los fosfo y glicolípidos e incrementan la cantidad de ácidos grasos libres en el extracto cuando son extraídos con una mezcla cloroformo-metanol. Este problema se resuelve haciendo una extracción previa con isopropanol y posteriormente se hace otra extracción con una mezcla cloroformo-isopropanol. Debido a lo anterior, la biomasa de *S. minima* (1 gbh) fue macerada con 100 ml de isopropanol. Esta mezcla se filtró y el sólido fue mezclado con 200 ml de una solución cloroformo-isopropanol (1:1 v/v). Nuevamente se filtró la mezcla y los filtrados de propanol y de cloroformo-isopropanol se combinaron y los solventes fueron evaporados. El extracto crudo (residuo remanente de la evaporación de solventes) se disolvió en 20 ml de una mezcla cloroformo-metanol (2:1 v/v) y posteriormente fue purificado por el método de Folch.

Purificación de lípidos (Folch et al., 1957).

Los contaminantes no lípidos como aminoácidos lipofílicos, polipéptidos y proteínas hidrofóbicas fueron eliminados adicionando al extracto (20 ml) 6 ml de NaCl 0.73%. Después de homogeneizarlo se dejó reposar 12 h a 4°C. Posteriormente, la fase

acuosa se desechó y a la fase no polar se le agregaron 15 ml de una mezcla cloroformo-metanol-NaCl 0.73% (3-47-48; v/v/v) y se dejó reposar durante 4 h a 4°C. Nuevamente se descartó la fase acuosa y la no polar se filtró sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a un volumen de 25 ml con cloroformo-metanol para la cuantificación de los lípidos.

Cuantificación de lípidos por el Método Espectrofotométrico Sulfofosvanillina (Ahlgren y Merino, 1991).

Los lípidos fueron cuantificados usando el método basado en la reacción de la sulfofosfovanillina, la cual produce un complejo rojo. La curva patrón se realizó con ácido linoleico disuelto en una mezcla cloroformo-metanol (2:1 v/v), con concentraciones de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/ml. El solvente de las muestras y de los estándares se dejó evaporar a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó 1.0 ml de ácido sulfúrico concentrado y se colocaron en un baño de agua en ebullición (100°C) durante 10 minutos. Una vez que las muestras se enfriaron, se les agregó 5 ml del reactivo vanillina mezclando perfectamente. Después de 2 h se determinó la absorbancia a 528 nm.

5.1.7 Determinación del contenido de carbohidratos (Hernández y Olguín, 2002).

Los carbohidratos (azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados) se cuantificaron al reaccionar con fenol en medio ácido produciendo un compuesto

colorido. Se preparó una suspensión de 0.1 g seco de biomasa en 100 ml de agua destilada, la cual se mantuvo en agitación para tomar alícuotas de 1 ml. A éstas se les añadió 1 ml de una solución de fenol (5% p/v) y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Esta mezcla se dejó en reposo por 30 min y se determinó la absorbancia a 488 nm. La concentración de carbohidratos se determinó en base a una curva patrón de glucosa con concentraciones de 0,20,40,60,80 y 100 µg/mL.

5.1.8 Determinación de la superficie específica (Kaewprasit et al., 1998).

Se utilizó el método de adsorción del azul de metileno para la cuantificación de la superficie específica de la biomasa de *S. minima*. 0.5 g de biomasa seca se colocaron en matraces Erlen Meyer con 125 mL de solución azul de metileno con diferentes concentraciones: 0, 5, 10, 15, 25, 35, 50, 60, 75, 100, 150, 175 mg/L. Éstos se agitaron a 180 rpm durante 24 h y se determinó su absorbancia de la solución a 660 nm después de que la biomasa fue eliminada. La determinación se realizó a temperatura ambiente (25°C).

La superficie específica se calculó con la siguiente expresión:

$$SE = (X_m)(N_o)(a)(1 \times 10^{-22})$$

Donde:

SE: superficie específica

X_m : masa de adsorbato necesaria para formar una monocapa sobre un gramo de adsorbente (mg)

N_0 : Número de Avogadro (6.02×10^{23})

a : área de una molécula del adsorbato (Å^2). Para el azul de metileno $a=197.2 \text{ Å}^2$

1×10^{-22} : factor de conversión de unidades para obtener el resultado en m^2/g

El valor de X_m se determina mediante el modelo de adsorción de Lagmuir:

$$(C/X) = [(1/X_m)k] + (C/X_m),$$

Donde:

C = concentración final de la solución en equilibrio

X_m = cantidad de soluto adsorbido por gramo de solvente

k =constante relacionada con la energía de adsorción

El inverso de la pendiente de la función lineal que resulta al graficar C/X contra C , corresponde al valor de X_m .

5.1.9 Cuantificación de Acidez total (Schnitzer y Gupta, 1965; Prado et al., 1999; Schneider y Ribeiro, 1999).

La acidez total, la cual comprende los grupos carboxilo (R-COOH), (Ar-COOH) e hidroxil fenólicos (Ar-OH) fue cuantificada a través de la reacción de dichos grupos con el hidróxido de bario. A 50 mg de muestra seca se le adicionaron 200 ml de hidróxido de bario 0.125 M y se agitó durante 24 horas. Paralelamente se corrió un blanco de hidróxido de sodio. Posteriormente la muestra se filtró (papel whatman

No.42) y el residuo se lavó con agua desionizada libre de CO₂. El filtrado más el agua de lavado se tituló con ácido clorhídrico 0.05 M hasta alcanzar un pH de 8.4.

La acidez total se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez total (mmol H}^+/\text{g de biomasa)} = (V_{A1} - V_{A2}) \times C_a \times 1000 / m_b$$

donde:

V_{A1} = volumen de HCl utilizado para el blanco

V_{A2} = volumen de HCl utilizado para la muestra

C_a = concentración molar del HCl

m_b = mg de biomasa utilizada

5.1.10 Cuantificación de Acidez carboxílica (Schnitzer and Gupta, 1965; Prado et al., 1999).

La determinación de grupos carboxilo se basa en la reacción de éstos con acetato de calcio provocando su desprotonización. A 50 mg de muestra seca se le adicionaron 50 ml de acetato de calcio 0.2 M y se agitó durante 24 horas. Posteriormente la muestra se filtró (papel Whatman No.42) y el residuo se lavó con agua desionizada libre de CO₂. El filtrado más el agua de lavado se tituló con hidróxido de sodio 0.1 M hasta alcanzar un pH de 9.8.

Los grupos carboxilo se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez carboxílica (mmol H}^+/\text{g de biomasa)} = (V_{B1} - v_{B2}) \times C_b \times 1000 / m_b$$

V_{B1} = volumen de NaOH utilizado para el blanco

v_{B2} = volumen de NaOH utilizado para la muestra

C_a = concentración molar del NaOH

m_b = mg de biomasa utilizada

5.1.11 *Cuantificación de Grupos hidroxil fenólicos (Schnitzer, 1982; Flores-Céspedes et al. 2002).*

La cantidad de grupos hidroxil fenólicos se determinaron usando la siguiente expresión:

Grupos hidroxil fenólicos (mmol/g) = Acidez total en la superficie – Grupos carboxilo

5.2 Evaluación de la hiperacumulación de Pb^{2+} en *S.minima* y de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular

5.2.1 Estrategia experimental

Para entender algunos de los mecanismos involucrados en la hiperacumulación de Pb^{2+} en *S. minima* se investigó la cinética de la adsorción y la acumulación intracelular del metal. Para cumplir este objetivo se llevó a cabo la estrategia experimental descrita en la Figura 8. Con los resultados obtenidos se realizó el balance de masa (Pb^{2+}) en el sistema, llamado análisis de compartamentalización y se evaluó la eliminación de Pb^{2+} en columna de agua. Se calculó el factor de bioconcentración (FBC) y se calcularon y propusieron, por primera, vez los factores de adsorción (FAD) y factores de acumulación intracelular (FAI). Se investigó la cinética de adsorción, equilibrio de adsorción y cinética de acumulación intracelular.

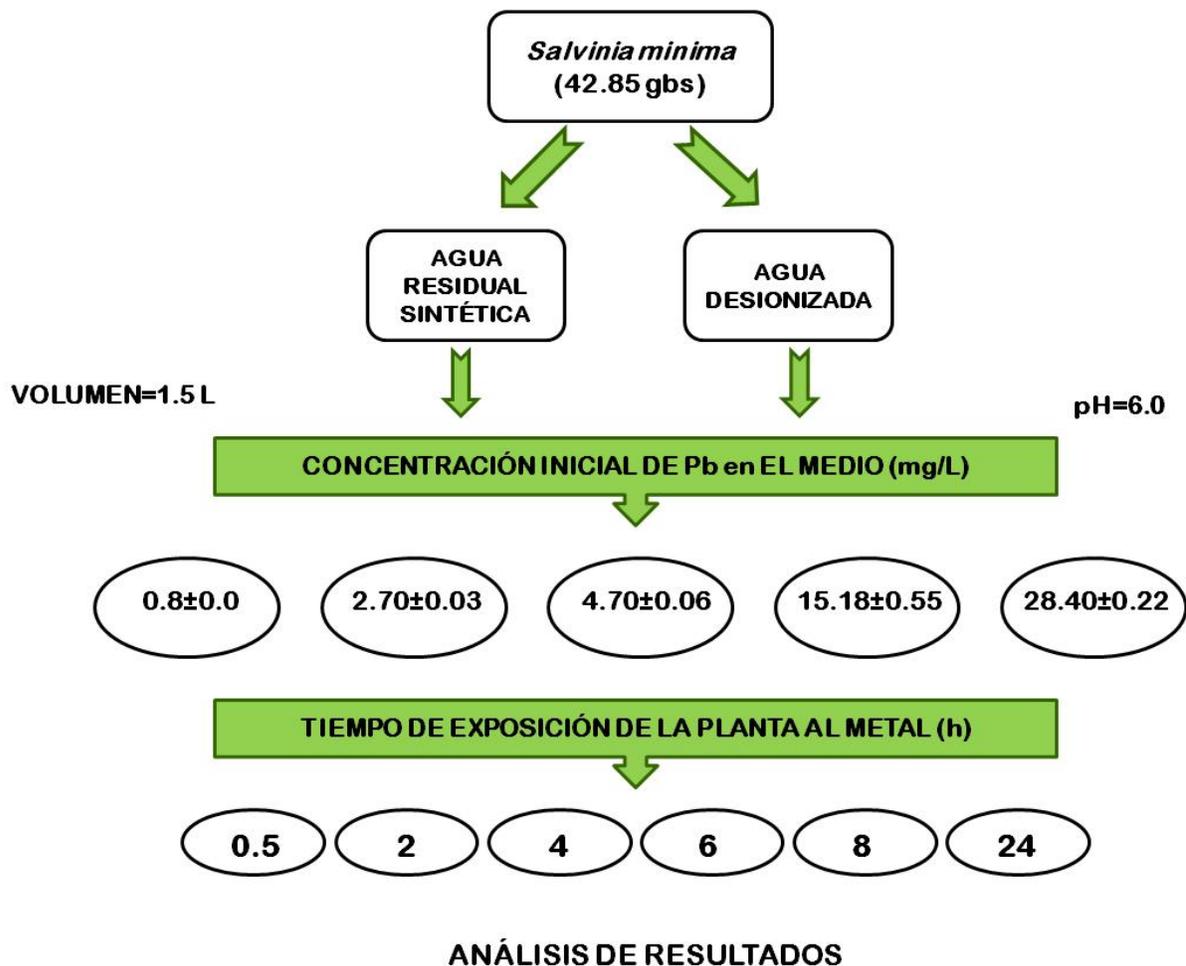


Figura 8. Estrategia experimental para evaluar la hiperacumulación de acumulación de Pb^{2+} en *S. minima* y profundizar en los mecanismos involucrados.

5.2.2 Preparación del inóculo

S. minima fue cultivada en medio sintético Hutner modificado 1/10 a pH 6.0. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25°C y a una intensidad luminosa de 116 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 25°C, operando en ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas. Este inóculo se lavó bajo la corriente de agua de llave

por 5 minutos para reducir la presencia de microalgas presentes en la superficie de la planta.

5.2.3 Unidades experimentales

Se utilizaron contenedores de plástico (0.145m x 0.175m) con 1.5 L de medio y a los cuales se les adicionó 26.37 gbh (42.85 gbs) de biomasa lavada. La superficie total era de 0.02537 m², mientras que la columna de agua tenía una profundidad de 0.06m. El agua residual sintética (ARS) contenía ácido propiónico (98 mg/L) y sulfato de magnesio (107 mg/L). Se utilizó una solución patrón de nitrato de Pb²⁺ (1 g/L), la cual se diluyó en el medio correspondiente para obtener la concentración deseada. Cabe señalar que se establecieron unidades experimentales por cada tiempo de exposición, es decir, que no se utilizó una misma unidad experimental para tomar muestras en todos los tiempos de exposición evaluados. Por cada tratamiento se instalaron 3 unidades experimentales. Se incluyeron dos tipos de controles. El primero con Pb²⁺ a la misma concentración inicial (C_i) del tratamiento sin biomasa, el cual fue usado para determinar la posible adsorción del metal en la superficie de los contenedores. El segundo contenía biomasa pero el medio estaba libre de Pb²⁺ y se utilizó para confirmar la ausencia de Pb²⁺ en la planta y en el medio. Estas unidades experimentales se colocaron en una cámara de crecimiento con una temperatura de 25°C y una intensidad luminosa de 116 μmol/m²s (Fig. 9).

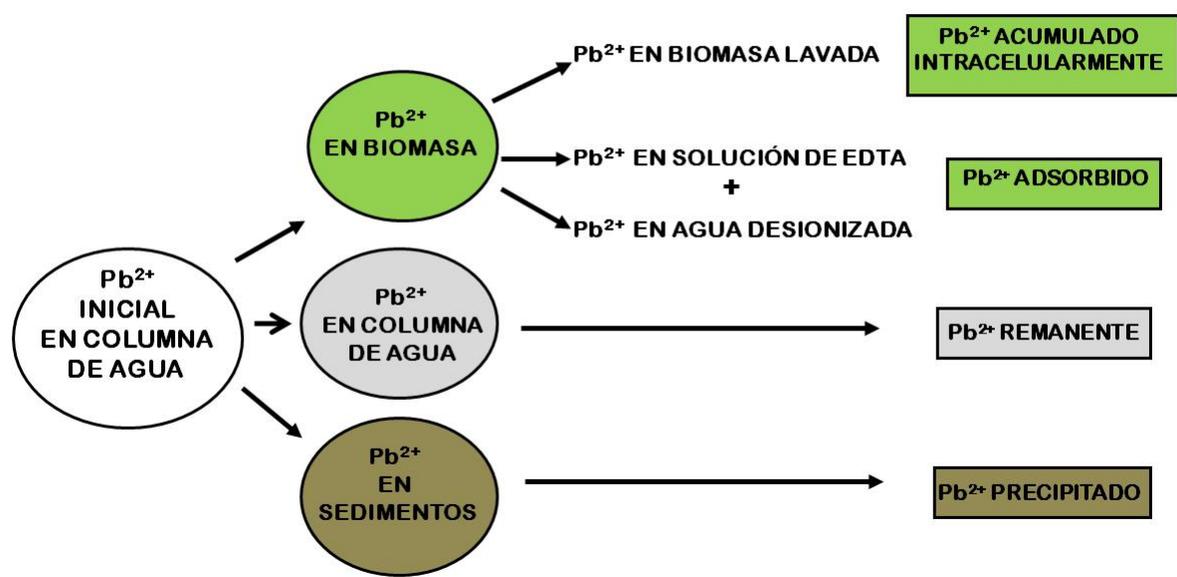


Figura 9. Unidades experimentales

5.2.4 Análisis de compartimentalización

Éste se llevó a cabo de acuerdo a Olguín *et al.* (2005), en el cual se diferencian 4 compartimentos donde el metal puede ser encontrado (Fig.10), en la biomasa, ya sea adsorbido a su superficie o acumulado intracelularmente, en la columna de agua y en los sedimentos.

(a)
$$Pb_i = Pb_{BL} + (Pb_{EDTA} + Pb_{AD}) + Pb_{CA} + Pb_S$$



(b) *Salvinia minima* EXPUESTA A Pb

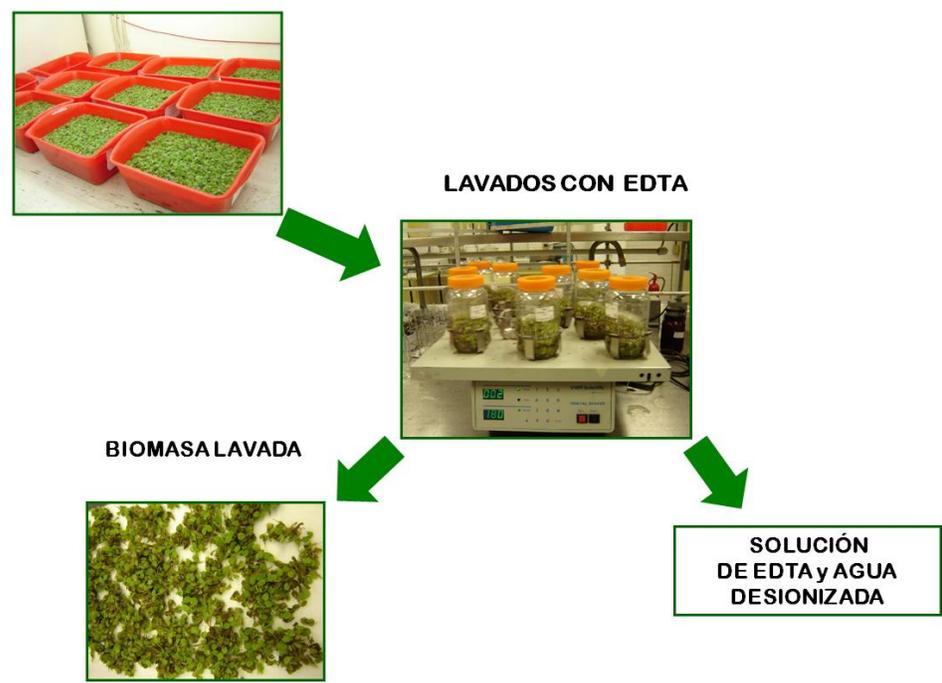


Figura 10. Análisis de compartimentalización (a) y lavado de *S. minima* (b)

Para cuantificar el contenido de Pb^{2+} en cada compartimento se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

5.2.5 Cuantificación de Pb^{2+} en columna de agua

En cada tiempo de exposición, se tomaron muestras de la columna de agua y se filtraron con papel Whatman (tamaño de poro=11 μ m) para eliminar residuos y fueron analizadas en un espectro de absorción atómica marca Buck Scientific 210-VGP, usando flama aire-acetileno. La curva patrón se elaboró con un estándar de nitrato de plomo diluido en ácido nítrico grado ultrapuro (sigma) al 10% (v/v), para tener concentraciones de 0, 1, 5, 10, 15 y 20 mg Pb^{2+} /L.

5.2.6 Lavado de biomasa y cuantificación de Pb^{2+} en biomasa

La biomasa fue retirada del contenedor en cada tiempo de exposición y lavada con agua para eliminar residuos del medio. Posteriormente fue lavada con 200 ml de una solución de EDTA (relación molar EDTA/Pb=12) durante una hora en agitación a 180 rpm. Después de esto se lavó con 400 ml de agua desionizada y el Pb^{2+} fue cuantificado en ambos lavados para conocer la cantidad de metal adsorbido a la superficie de la planta. Para cuantificar el Pb^{2+} acumulado intracelularmente, la biomasa lavada fue secada a 50°C hasta obtener un peso constante. 0.05 g de dicha biomasa se dejó reposar por 12 h con 10 ml de ácido nítrico concentrado (grado reactivo). Posteriormente la biomasa se colocó en un bloque de digestión (AIM 500-C) a una temperatura de 150 °C durante 60 min hasta la desaparición de vapores

pardos. Nuevamente se adicionaron 5 ml de ácido nítrico concentrado y se concentró la muestra hasta tener un volumen de 1 ml, el cual fue llevado hasta un volumen de 50 ml con ácido nítrico al 10% (v/v). Estas soluciones fueron analizadas en el espectro de absorción atómica como se describió anteriormente para las muestras de la columna de agua.

5.2.7 Cinética de eliminación de Pb^{2+} en la columna de agua

Para describir la variación del contenido de Pb^{2+} en la columna de agua en función del tiempo, se utilizaron dos modelos cinéticos:

a) Modelo de una cinética de primer orden descrito por la expresión:

$$\frac{-dC}{dt} = k_1 C$$

la cual se resuelve como:

$$\ln C = -k_1 t + \ln C_0$$

donde:

C_0 y C es la concentración de Pb^{2+} en la columna de agua al tiempo cero y tiempo t , respectivamente (mg/L)

k_1 es la constante de velocidad (h^{-1})

t es el tiempo (h)

b) Modelo de una cinética de segundo orden que se describe con la siguiente ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = -k_2 C^2$$

la cual se resuelve como:

$$1/C = 1/C_0 + k_2 t$$

donde:

C_0 y C es la concentración de Pb^{2+} en la columna de agua al tiempo cero y tiempo t , respectivamente (mg/L)

k_2 es la constante de velocidad (L/mg h)

t es el tiempo (h)

5.2.8 Factor de Bioconcentración (FBC), Factor de Adsorción (FAD) y Factor de Acumulación Intracelular (FAI)

El factor de bioconcentración (Zayed et al., 2008) se define como:

FBC = Contenido de Pb^{2+} en el tejido de la biomasa (mg/Kg biomasa bs)

Concentración inicial del metal en la solución (mg/L)

El FAD y el FAI son dos factores novedosos que se proponen por primera vez a partir del presente trabajo de tesis y que se describen de la siguiente forma:

FAD = Contenido de Pb^{2+} adsorbido en la biomasa (mg/Kg biomasa bs)

Concentración inicial del metal en la solución (mg/L)

FAI = Contenido de Pb^{2+} acumulado intracelularmente (mg/Kg biomasa bs)

Concentración inicial del metal en la solución (mg/L)

5.2.9 Cinética de adsorción de Pb^{2+}

Para evaluar la cinética de adsorción de Pb^{2+} a la biomasa de *S. minima* se utilizaron dos modelos de velocidad, la cinética de pseudo-primer orden y la cinética de pseudo-segundo orden .

La cinética de pseudo-primer orden se conoce como el modelo de Lagergren (Lazaridis y Asouhidou, 2003) y se expresa como:

$$\frac{dq}{dt} = k_1(q_e - q_t)$$

la cual se resuelve como:

$$\ln (q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t$$

donde:

q_t y q_e son la capacidad de adsorción (mg/g) al tiempo t (h) y en el equilibrio, respectivamente.

k_1 es la constante de velocidad de la adsorción de primer orden (1/h).

Por otro lado, la cinética de pseudosegundo orden fue por primera vez descrita por Ho y McKay (1999), cuya expresión es:

$$\frac{dq}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2$$

y se resuelve como:

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}$$

además,

$$k_2 q_e^2 = h$$

donde:

t es el tiempo de contacto (h)

q_t y q_e son la capacidad de adsorción (mg/g) al tiempo t y en el equilibrio, respectivamente.

k_2 es la constante de velocidad de la adsorción de pseudo-segundo orden (g/mg h)

h es la velocidad inicial de adsorción (mg/g h).

5.2.10 Equilibrio de adsorción de Pb^{2+}

El equilibrio de adsorción de Pb^{2+} a la biomasa de *S.minima* fue evaluado usando dos modelos (Volesky, 2003):

a) Modelo de Langmuir

$$q = \frac{q_{\max} b C_e}{1 + b C_e}$$

donde:

q es la capacidad de adsorción

q_{\max} es la capacidad máxima de adsorción (mg/g)

b es la constante de Langmuir relacionada a la energía de adsorción (L/mg)

C_e es la concentración del metal en la fase líquida en el equilibrio (mg/L).

b) Modelo de Freundlich:

$$q = K C_e^{1/n}$$

donde:

K [(mg/g)(L/mg)^{1/n}] y n son las constantes de Freundlich relacionadas a la capacidad e intensidad de la adsorción, respectivamente.

C_e es la concentración del metal en la fase líquida en el equilibrio (mg/L).

5.2.11 Cinética de acumulación intracelular

El modelo de Michaelis–Menten (Abedin et al., 2002) fue empleado para describir la acumulación intracelular de los iones de Pb en las células de *S. minima* en el intervalo de las C_i probadas.

$$V = \frac{V_{max} [Pb]}{K_m + [Pb]}$$

donde:

V : velocidad de la acumulación intracelular de Pb^{2+} al tiempo t (mg Pb/g biomasa h)

V_{max} : velocidad máxima de la acumulación intracelular de Pb^{2+} (mg Pb/g biomasa h)

K_m : concentración de Pb^{2+} a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima de acumulación intracelular (mg/L).

$[Pb]$: concentración de Pb^{2+} en la solución (mg/L)

Los datos obtenidos a las 4 h fueron elegidos para investigar la cinética dependiente de la concentración ya que a este tiempo, relativamente corto, se observó una velocidad de acumulación constante.

5.2.12 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis paramétricos (ANOVA) y no paramétricos, regresiones lineales y no lineales usando el programa SPSS. El nivel de significancia de $p < 0.05$ fue considerado para determinar los valores estadísticamente diferentes.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización de la biomasa de *Salvinia minima*

6.1.1 Cuantificación de microalgas (cianobacterias) rizosféricas

S. minima cultivada en medio Hutner modificado 1/10 bajo las condiciones descritas en la sección de material y métodos, crece asociada con una cianobacteria que se adhiere principalmente a su pseudo-raíz, la cual fue identificada como *Lyngbya* sp. (Olguín *et al.*, 2008)(Fig. 11).

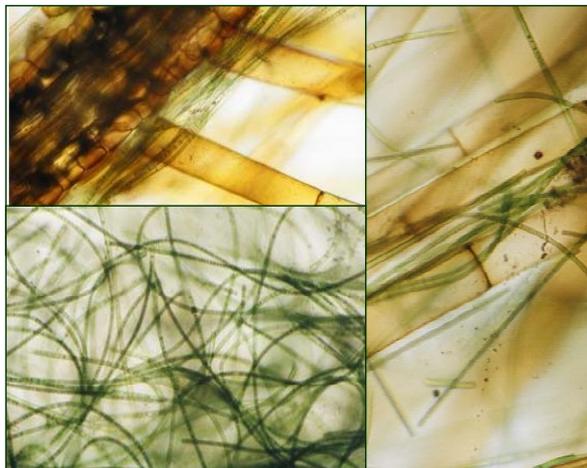


Figura 11. *Lyngbya* sp. (Olguín *et al.*, 2008)

Para reducir la presencia de dicha cianobacteria en los experimentos sobre la evaluación de los mecanismos de eliminación de Pb^{2+} por *S. minima*, ésta se sometió a lavados con agua corriente durante 5 minutos. La cantidad de microalgas cuantificada a través de la concentración de clorofila antes y después del lavado reveló que aquella fue reducida al mínimo ya que decreció en 92.45% (Fig. 12).

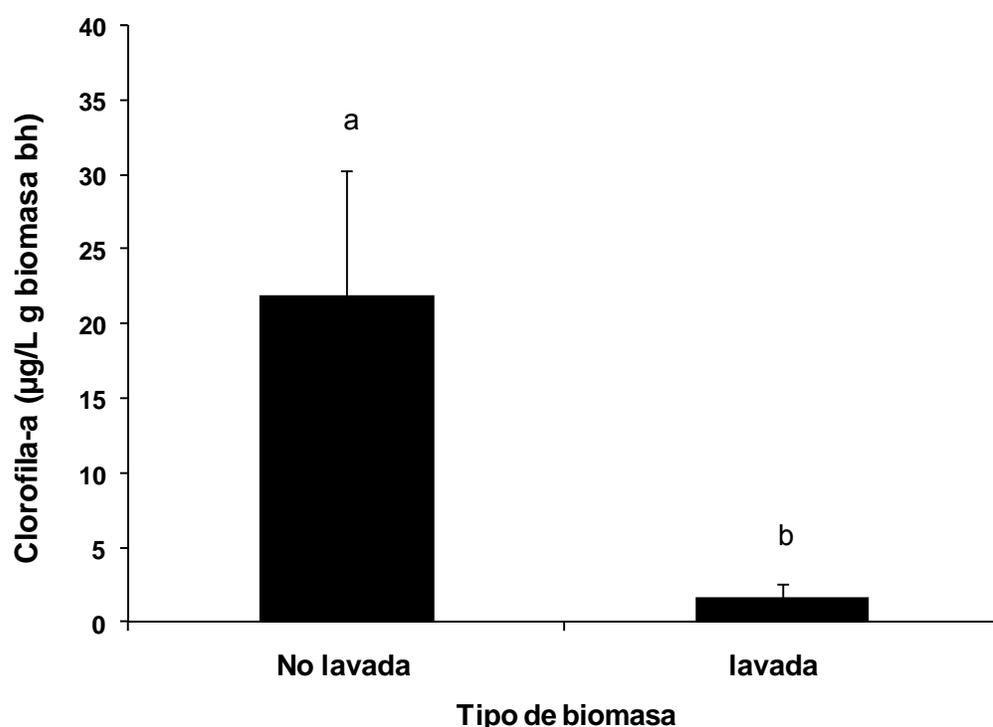


Figura 12. Contenido de clorofila de microalgas rizosféricas en biomasa de *S.minima* lavada y no lavada (barras con letras diferentes son significativamente diferentes, $p<0.05$).

Por lo anterior, puede considerarse que el papel de dicha cianobacteria en el proceso de eliminación por *S. minima* es despreciable. De hecho, no se observaron

diferencias significativas en la eliminación de Pb^{2+} cuando *Lyngbya* sp. estuvo o no presente en la superficie de *S. minima* a lo largo de 24 h de exposición a Pb^{2+} (Olguín *et al.*, 2008).

6.1.2 Características fisicoquímicas de *S.minima*

En la eliminación de metales por biomasa, las características fisicoquímicas de la misma juegan un papel fundamental. Debido a lo anterior y a que no existen reportes en la literatura sobre las propiedades fisicoquímicas de la biomasa de *S. minima*, se realizó la caracterización fisicoquímica de este helecho acuático. Los resultados mostraron que la biomasa de *S.minima* contiene una gran cantidad de agua (Tabla 3) y una cantidad considerable de cenizas, similar a aquellas reportadas para otras plantas acuáticas flotantes colectadas en ecosistemas naturales o crecidas en agua residuales tales como *Azolla* (humedad:93.5%), *Wolffia* (humedad:96.4%)(FAO, 2004; Lengs *et al.*, 1995) y *Salvinia herzogii* (cenizas:10.2%) (Scheneider y Rubio, 1999). Por otro lado, los carbohidratos, proteínas y lípidos son macromoléculas predominantes en la biomasa de plantas, por lo que su cuantificación es importante para entender, en primera instancia, los mecanismos de enlace entre los iones metálicos y la biomasa. En *S. minima*, el contenido de carbohidratos encontrado (Tabla 2), es similar a aquel reportado para *S. molesta* (49.1%) (FAO, 2004), pero menor al de *S. herzogii* (77%), ambas crecidas en ecosistemas naturales (Scheneider y Rubio, 1999).

Tabla 2. Caracterización físico-química de *S.minima*

Parámetro	Valor
Materia seca (%)	4.12±0.14
Humedad (%)	95.88±0.14
Nitrógeno Total Kjeldahl ¹	4.60±0.38
Proteína ¹	27.46±0.78
Lípidos ¹	1.52±0.05
Carbohidratos totales ¹	48.50 ±2.17
Cenizas	13.75±0.008
Superficie específica (m ² /g _{biomasa})	264±13
Ácidez Total ²	3.93±0.09
Ácidez Carboxílica ²	0.95±0.02
Ácidez Hidroxifenólica ²	2.96±0.09

¹ Valores expresados en % bs

² Valores expresados en mmol H⁺/g bs

El contenido de proteína es tan alto como el reportado para *Azolla filiculoides* cuando ésta última fue crecida en un efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales (26.96%) (Costa *et al.*, 1999). Finalmente, la cantidad de lípidos es comparable a la reportada para *S. herzogii* (1.1%) crecida en cuerpos de agua (Schneider y Rubio, 1999) y para las frondas de *Salvinia natans* (1.4%), crecida en acuíferos de agua dulce en latitudes templadas (Rozentsvet *et al.*, 2005). Lo anterior confirma que tanto las especies como el medio, en el cual son crecidas, son factores que afectan la composición química de diferentes plantas acuáticas (Cao *et al.*, 2004).

Por otro lado, el conocer la superficie específica y la cantidad de grupos carboxilo permite un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en la eliminación de metales. Muy pocos trabajos en la literatura reportan la superficie específica de plantas pero en el caso de células algales se ha descrito que la relación superficie específica/peso seco es un factor muy importante con gran influencia en la adsorción de metales (Tien, 2002). El valor encontrado para *S. minima*, bajo las condiciones de cultivo utilizadas, es alto y comparable al reportado para otra planta acuática flotante, *E. crassipes* (250 m²/g) (Schneider y Rubio, 1999), la cual a diferencia del género *Salvinia*, tiene un gran sistema radicular que es responsable en gran medida de la alta capacidad de eliminación de metales de dicha planta (Jayaweera *et al.*, 2008). De hecho, únicamente la raíz de *E. crassipes* tiene una superficie específica de 243 m²/g (Schneider *et al.*, 2001) mientras que se ha reportado que la de las pseudo-

raíces de *S. herzogii* es tan pequeña como 2.2 m²/g (Suñe *et al.*, 2007). La gran superficie específica encontrada en *S. minima* se debe principalmente a la presencia de tricomas tanto en la parte superior como en la inferior de las frondas así como en la pseudo-raíz (Fig. 13).



Figura 13. Superficie superior de las frondas (a), tricomas (b) (Jacono, 2003), superficie inferior de las frondas y pseudo raíz de *S.minima* (c) (Foto: Sánchez-Galván,G.)

Finalmente, se ha reportado el papel fundamental que juegan los grupos funcionales ácidos en la eliminación de metales a través del intercambio de iones en la superficie

de la biomasa de diversos organismos como plantas y algas (Schneider y Rubio, 1999; Davis *et al.*, 2003). En este sentido, en la biomasa de *S. minima* se cuantificó la acidez total, la cual comprende los grupos carboxilo (R-COOH), (Ar-COOH) e hidroxil fenólicos (Ar-OH) (Fig. 14).

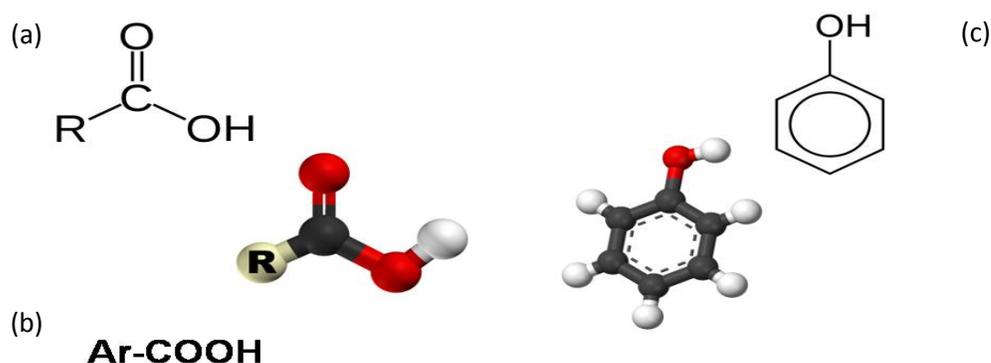


Figura 14. Estructura de los grupos carboxilo (a,b) y de los grupos hidroxifenólicos (c).

Los resultados mostraron que el contenido de acidez carboxílica e hidroxifenólica en *S. minima* son similares a los reportados para *S. herzogii* (0.9 y 2.2 mmol H⁺/g biomasa) y mayores a los encontrados en *E. crassipes* (0.7 y 0.9 mmol H⁺/g biomasa) (Schneider y Rubio, 1999), mientras la acidez total fue mayor a la reportada para las raíces de *P. stratiotes* (0.3571 mmol/H⁺/g) (Suñe *et al.*, 2007).

6.2 Evaluación de la hiperacumulación y de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de Pb^{2+} en *Salvinia minima*

6.2.1 Eliminación de Pb^{2+} en la columna de agua en lagunas con *S.minima*

Como se mencionó anteriormente, para entender algunos de los mecanismos involucrados en la hiperacumulación de Pb^{2+} se investigó su cinética de adsorción y de acumulación intracelular en *S. minima*. En este punto fue importante entender el efecto de algunos factores sobre la acumulación de metales en este tipo de sistemas y de plantas. Entre los más importantes se encuentran la presencia de sustancias inorgánicas y orgánicas, la concentración inicial del metal en la columna de agua (C_i) y el tiempo de exposición (T_e) de la planta al metal.

El primer parámetro a evaluar fue la eliminación de Pb^{2+} de la columna de agua. Ésta fue muy alta ($86\pm 3.0\%$) durante la primera media hora de exposición especialmente a la concentración más baja (Fig. 15a,b). Durante el mismo periodo inicial, a mayores concentraciones de plomo, las remociones fueron $63.40\pm 5.6\%$ y $36\pm 2.54\%$ para 15.18 ± 0.55 y 28.40 ± 0.22 mg Pb^{2+}/L , respectivamente. Al final del tiempo de exposición (24h), el Pb^{2+} fue casi completamente eliminado en la mayoría de los casos ($95\pm 5.11\%$), pero en una menor proporción a la C_i más alta ($88.78\pm 0.32\%$) con o sin la presencia del ácido propiónico y del sulfato de magnesio.

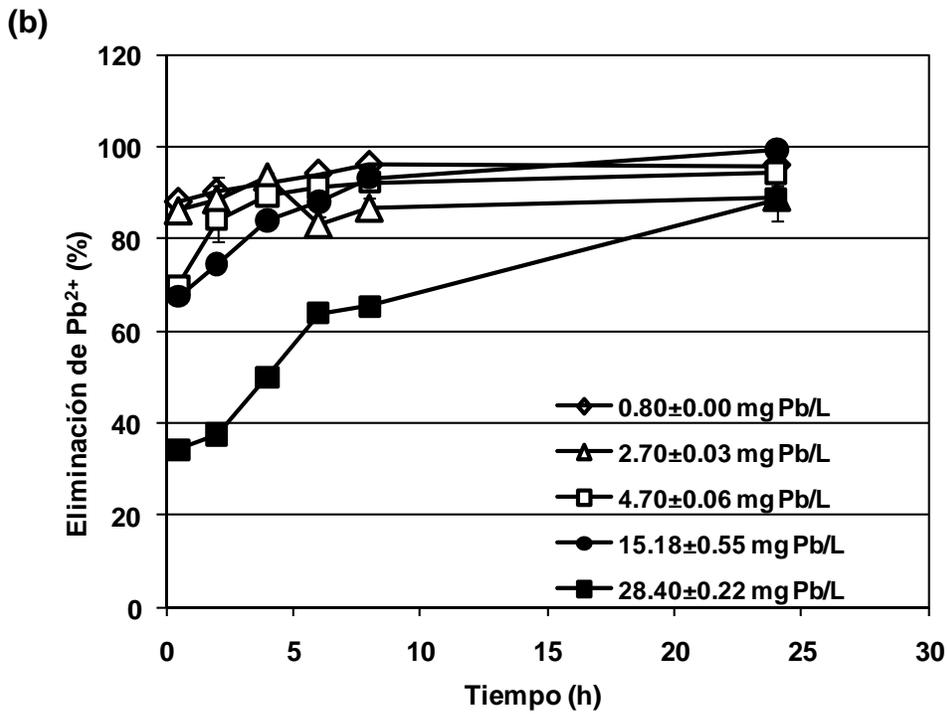
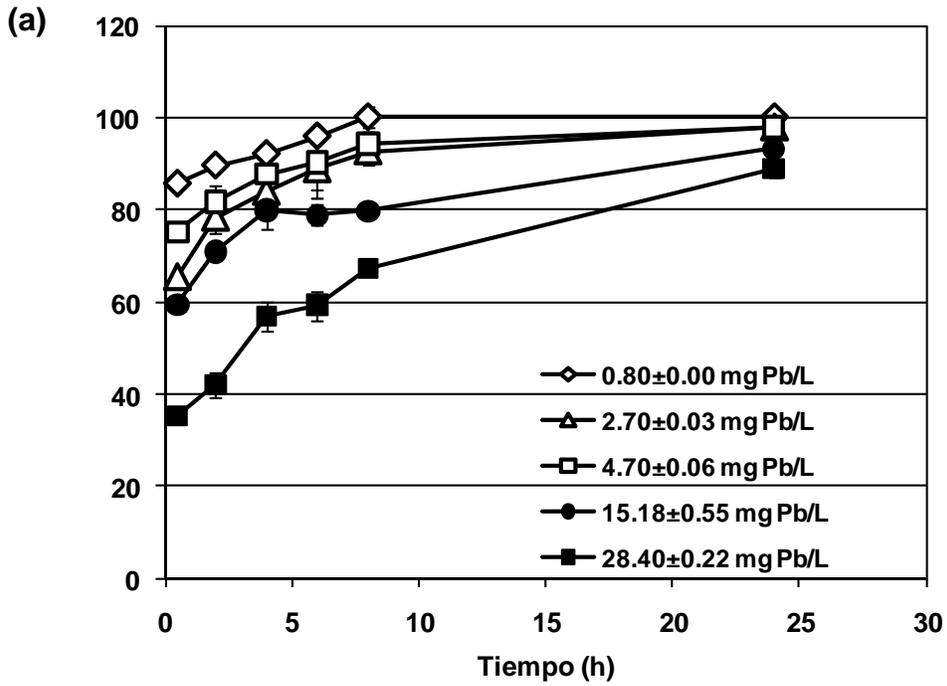


Figura 15. Eliminación de Pb^{2+} (%) en sistemas de lagunas con *S. minima* en ARS (a) y AD (b).

En la presencia de éstos últimos (ARS), se encontró una correlación altamente positiva ($r^2 > 0.9$) entre el porcentaje de eliminación de Pb^{2+} de la columna de agua y el tiempo de exposición, es decir que a medida que incrementó el tiempo de exposición se incrementó la eliminación del metal.

Por otro lado, se encontró una correlación negativa entre C_i y el porcentaje de eliminación, ($R^2 > 0.874$). Por el contrario, en su ausencia (AD) el proceso de eliminación de Pb^{2+} fue más rápido en las más bajas C_i probadas (0.80 ± 0.00 y 2.70 ± 0.03 mg Pb^{2+}/L) ya que no se encontró una correlación entre el tiempo de exposición y los resultados sólo hasta que la C_i era de 4.70 ± 0.06 mg Pb^{2+}/L ($r^2 = 0.972$). La C_i afectó negativamente la eliminación del metal especialmente en las dos primeras horas ($p < 0.05$). Al final del periodo de evaluación (24h) no se observaron diferencias significativas entre los diferentes medios en la mayoría de las C_i probadas.

Para entender los mecanismos de eliminación de metales por plantas es importante conocer en principio la cinética de eliminación del contaminante del sistema, es decir de la columna de agua. Por lo anterior, los resultados se evaluaron a través de la ecuación cinética de primer orden y se encontró que aquellos obtenidos a la C_i más baja no se ajustaron en ARS (Tabla 3). A mayores C_i los datos se ajustaron a dicho modelo aunque los coeficientes obtenidos no fueron altos ($r^2 = 0.74-0.78$) excepto para aquellos de la mayor C_i ($r^2 = 0.94$).

Tabla 3. Constantes de velocidad de la eliminación de Pb^{2+} (k) en lagunas operadas por lote con *S. minima* usando dos diferentes modelos cinéticos.

C_i (mg/L)	ARS						AD					
	Cinética de primer orden			Cinética de segundo orden			Cinética de primer orden			Cinética de segundo orden		
	k (1/h)	R^2	P	k (L/mg h)	R^2	p	k (1/h)	R^2	P	k (L/mg h)	R^2	p
0.80±0.00	0.072±0.002	0.173	0.354	0.336±0.020	0.048	0.636	0.056±0.004	0.202	0.312	0.471±0.06	0.139	0.409
2.70±0.03	0.128±0.004	0.782	0.008	0.678±0.001 ^a	0.989	<0.001	0.038±0.001	0.124	0.439	0.0146±0.004	0.003	0.90
4.70±0.06	0.133±0.010	0.771	0.009	0.408±0.060 ^b	0.994	<0.001	0.109±0.012	0.671	0.024	0.270±0.045 ^a	0.989	<0.001
15.18±0.55	0.085±0.006	0.747	0.012	0.040±0.001 ^c	0.971	<0.001	0.157±0.020	0.891	<0.001	0.243±0.05 ^a	0.946	<0.001
28.40±0.22	0.080±0.007	0.942	<0.001	0.012±0.002 ^d	0.964	<0.001	0.080±0.004	0.931	<0.001	0.0115±0.001 ^b	0.979	<0.001

ARS= agua residual sintética AD= agua desionizada

Los valores promedio con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Algo similar ocurrió para los datos obtenidos con sólo AD, excepto que aquellos de la C_i de 2.70 ± 0.03 mg Pb^{2+}/L tampoco se ajustaron. Cuando los datos se evaluaron usando la ecuación cinética de segundo orden, se mejoró el ajuste en todos los casos con excepción de la más baja C_i y adicionalmente la C_i de 2.70 ± 0.03 en AD.

Lo anterior podría sugerir a que a dicha C_i tan baja, la eliminación de Pb^{2+} no depende de su concentración. Además, se encontró que la C_i afectó negativamente la constante de velocidad (k), ya que ésta disminuyó gradualmente conforme se incrementó la C_i especialmente en el ARS ($p < 0.05$) lo que indica que la eliminación de Pb^{2+} fue más lenta a medida que aumentó la C_i . En el caso del AD, lo anterior ocurrió únicamente entre las C_i más altas probadas que fueron 15.18 ± 0.55 y 28.40 ± 0.22 mg Pb/L . En ésta última, no se observó una diferencia significativa entre las constantes de velocidad obtenidas en ambos medios.

Se ha reportado previamente la eficiencia de los sistemas de lagunas con *S. minima* para eliminar Pb^{2+} (90%) de medio Hutner libre de EDTA y fosfatos en sistemas por lote (Olguín *et al.*, 2005). En el presente trabajo se evaluó la eficiencia de eliminación de Pb^{2+} en dicho sistema utilizando por primera vez concentraciones tan altas como 15.18 ± 0.55 y 28.40 ± 0.22 mg Pb^{2+}/L , además de ser el primer trabajo que reporta la cinética de dicha eliminación en este tipo de sistemas con *S. minima*. El sistema mostró ser muy eficiente en eliminar el Pb^{2+} de la columna de agua en ausencia (AD) y presencia de compuestos orgánicos e

inorgánicos (ARS) aun a dichas altas concentraciones, ya que en tan sólo 24 h la eliminación de Pb^{2+} estuvo en el intervalo de $96.13\pm 4.2\%$ y $88.82\pm 0.38\%$, correspondiendo a una velocidad de eliminación de 0.61 ± 0.05 y 1.11 ± 0.06 mg Pb^{2+} /L h, respectivamente. En experimentos con otras plantas acuáticas flotantes como las lemnáceas y bajo condiciones ambiental similares, se han encontrado menores porcentajes de eliminación de Pb^{2+} . Hurd y Sternberg (2008) reportaron una eliminación de 86% en un periodo de 24 h en un sistema por lote utilizando *Lemna minor* a una C_i de 5 mg Pb^{2+} /L mientras que en el presente trabajo se obtuvo una eliminación 10% mayor ($96.67\pm 1.99\%$) para una C_i similar (4.70 ± 0.06 mg Pb^{2+} /L), siendo las velocidades de eliminación ligeramente mayores (0.1791 vs 0.1895 ± 0.006 mg Pb^{2+} /L h, respectivamente). Por otro lado, a diferencia de lo observado en el presente trabajo, se ha reportado que en sistemas de lagunas con *Spirodela intermedia* la eliminación de Pb^{2+} del medio se ajusta altamente ($r^2=0.93$) al modelo de primer orden obteniendo una k de 0.617 min^{-1} mientras que con *Lemna minor*, el ajuste es bajo ($r^2=0.74$) similar al obtenido con *S. minima*, aunque en ambos reportes se trató de sistema multimetal (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Cr^{3+}) con una C_i de 1 mg metal/L (Miretzky *et al.*, 2004). Uysal y Taner (2009) reportaron una velocidad de eliminación de Pb^{2+} de 0.2912 h^{-1} en un sistema con *L. minor*, a una temperatura de 25°C y una C_i de 5 mg Pb^{2+} /L, mientras que con *S. minima* bajo condiciones similares se obtuvo una constante de velocidad mayor cuando se utilizó ARS (0.409 h^{-1}).

6.2.2 Análisis de compartimentalización de Pb^{2+} en lagunas con *S.minima*

Una vez evaluada la eliminación de Pb^{2+} de la columna de agua es necesario entender la distribución del metal en el microcosmos a través de un análisis de compartimentalización (Olguín *et al.*, 2005) (Fig. 16, 17, 18, 19). Se definieron 4 destinos (compartimentos) del metal: 1) Pb^{2+} adsorbido a la superficie de la biomasa, 2) Pb^{2+} acumulado intracelularmente en la biomasa, 3) Pb^{2+} remanente en la columna de agua y 4) Pb^{2+} precipitado presente en sedimentos. Los resultados obtenidos mostraron claramente que la mayor cantidad de Pb^{2+} eliminado de la columna de agua fue encontrado adsorbido a la superficie de la biomasa (41-75%) en todas las C_i y en todos los tiempos de exposición evaluados ($p < 0.05$) (Fig. 18a, Fig.20a). Por el contrario, el Pb^{2+} fue acumulado en las células en una menor proporción (4-45%) para todas las C_i en cada tiempo de exposición ($p < 0.05$) (Fig.18b, Fig.20b). Se utilizaron correlaciones de Spearman para conocer si existía una relación entre el porcentaje de Pb^{2+} adsorbido y el tiempo de exposición o la C_i y no se encontró correlación alguna con ninguno de los dos factores evaluados para el caso de ARS. Por el contrario, en el caso de AD se observó una correlación negativa con la C_i en el intervalo de 2 a 8 h ($r^2 = -0.90$), es decir que el porcentaje de Pb^{2+} adsorbido disminuyó conforme incrementó la C_i especialmente entre las C_i de 4.70 ± 0.06 mg Pb/L y las más altas (15.18 ± 0.55 y 28.40 ± 0.22 mg Pb/L). Lo anterior señala que la cantidad de Pb^{2+} adsorbida en *S.minima*, respecto a la cantidad inicial, no parece ser afectada por el tiempo, pero sí parece haber un efecto de la C_i a las concentraciones mayores, solamente en AD.

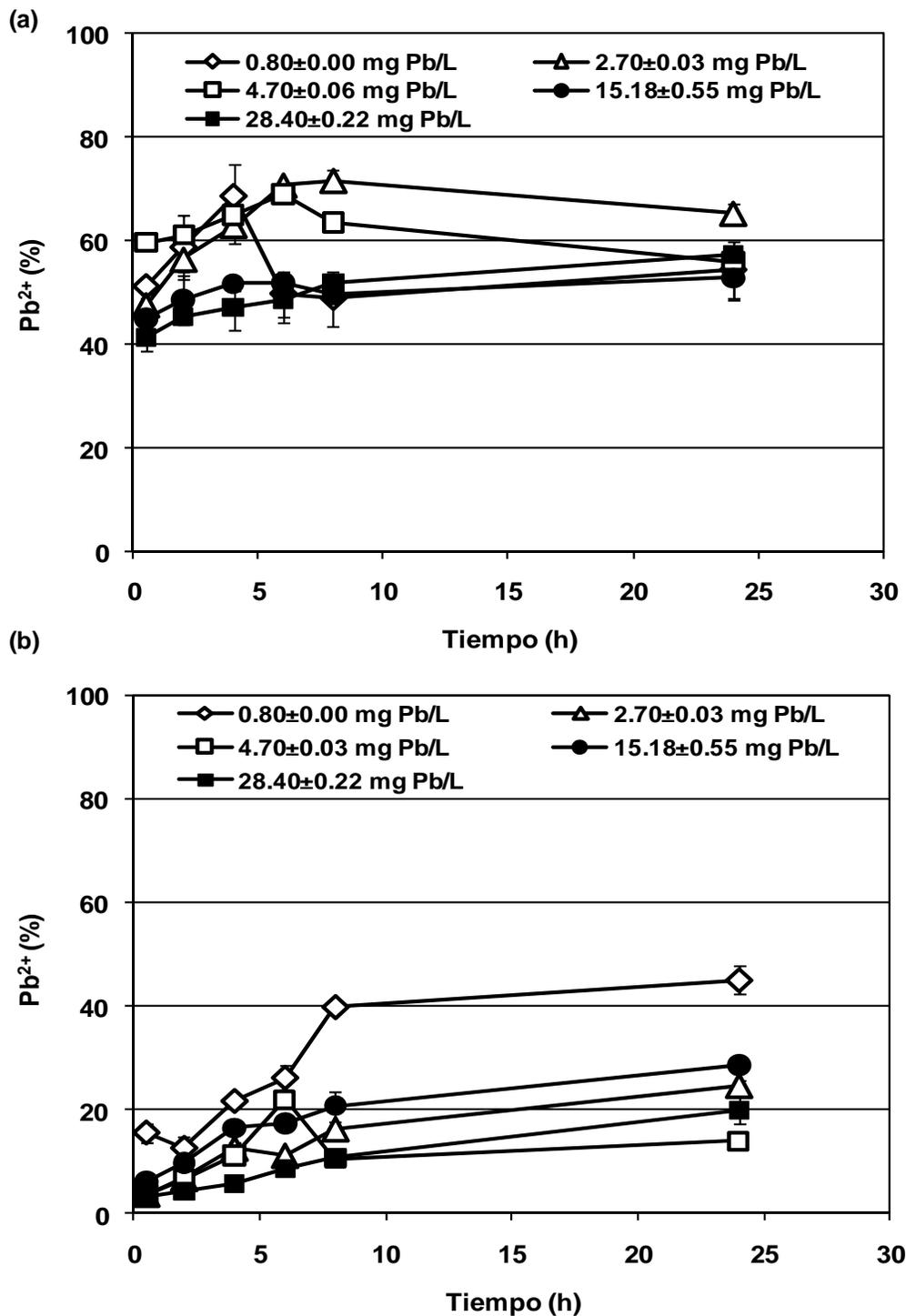


Figura 16. Análisis de compartimentalización de Pb^{2+} en lagunas con *S. minima* operadas por lote usando ARS. (a) Pb^{2+} adsorbido y (b) Pb^{2+} acumulado intracelularmente.

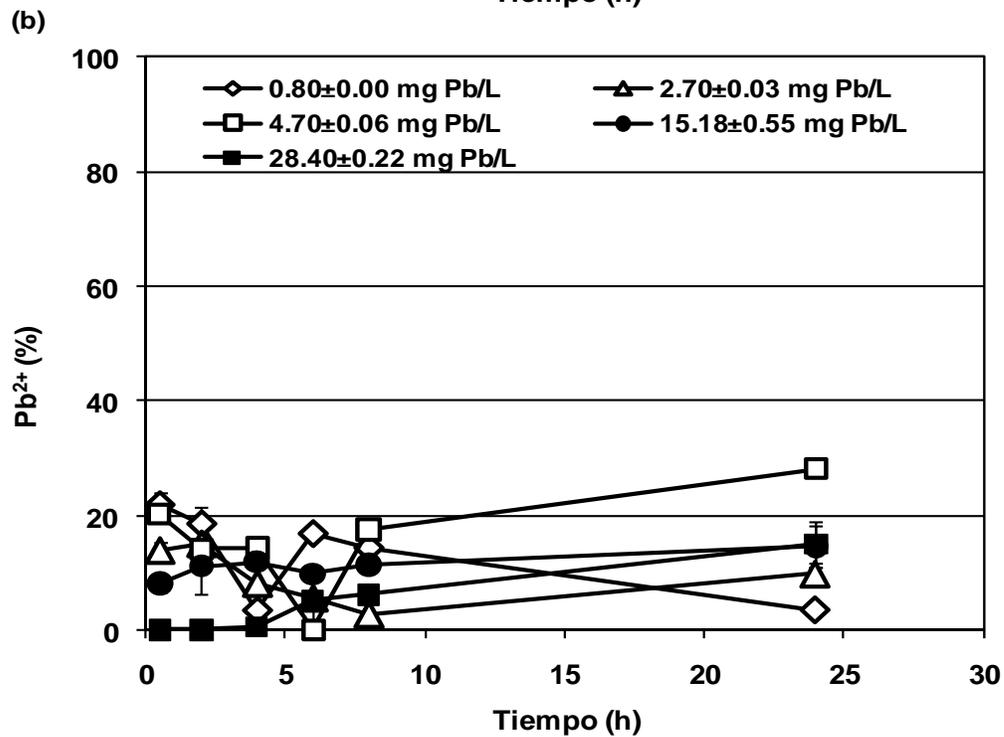
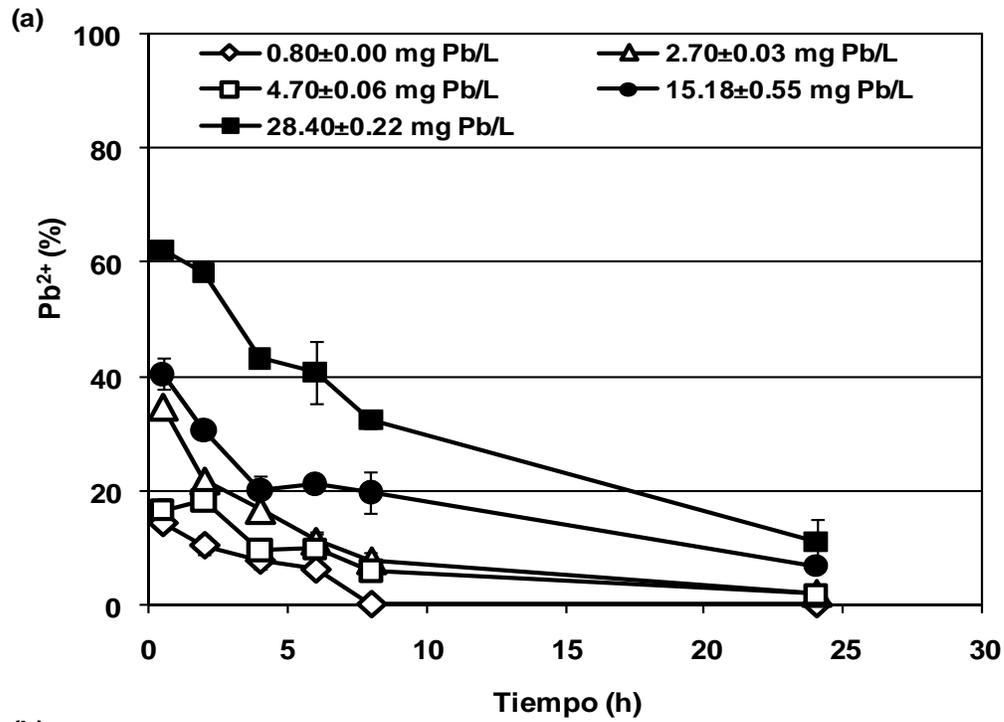


Figura 17. Análisis de compartimentalización de Pb²⁺ en lagunas con *S. minima* operadas por lote usando ARS. (c) Pb²⁺ remanente en columna de agua y (d) Pb²⁺ precipitado.

Por otro lado, como se esperaba se encontró una correlación altamente significativa entre el porcentaje de Pb^{2+} remanente en la columna de agua y el tiempo de exposición ($r^2 > 0.918$ para ARS y $r^2 > 0.88$ para AD) en la mayoría de las C_i probadas (Fig. 19a, Fig. 19b). Algo similar sucedió entre el porcentaje de Pb^{2+} remanente y la C_i en la mayoría de los tiempos de exposición evaluados ($r^2 > 0.875$ para ARS y $r^2 > 0.92$ para AD). Finalmente, el Pb^{2+} en sedimentos representó 20% o menos del total para ambos medios (Fig. 21a, Fig. 21b).

Resultados similares fueron obtenidos por Hurd y Sternberg (2008) quienes realizaron un balance de masa a las 24 h en un sistema con *L. minor* y una C_i de Pb^{2+} de 5 mg/L. Ellos encontraron que el porcentaje de Pb^{2+} en la biomasa, el remanente en la columna de agua y en los sedimentos fue de 82.85, 5.71 y 5.71%, respectivamente. En el caso de *S. minima* en AD, a una C_i de 4.70 mg Pb^{2+} /L, los porcentajes fueron 90, 3 y 8%, respectivamente. En sistemas con *S. minima* reportados previamente (Olguín *et al.*, 2005), se encontraron porcentajes similares de Pb^{2+} adsorbido (54%) y precipitado (15%) a los encontrados en el presente trabajo (52 y 14-18%, respectivamente), a una C_i de 12.7 ± 0.06 mg Pb^{2+} /L y en medio modificado Hutner 1/10 sin la adición de EDTA y fosfatos, a una C_i de 15.18 ± 0.55 mg/L en ambos medios. Por el contrario, el porcentaje de Pb^{2+} acumulado intracelularmente fue menor (19%) al encontrado en el presente trabajo (29-30%).

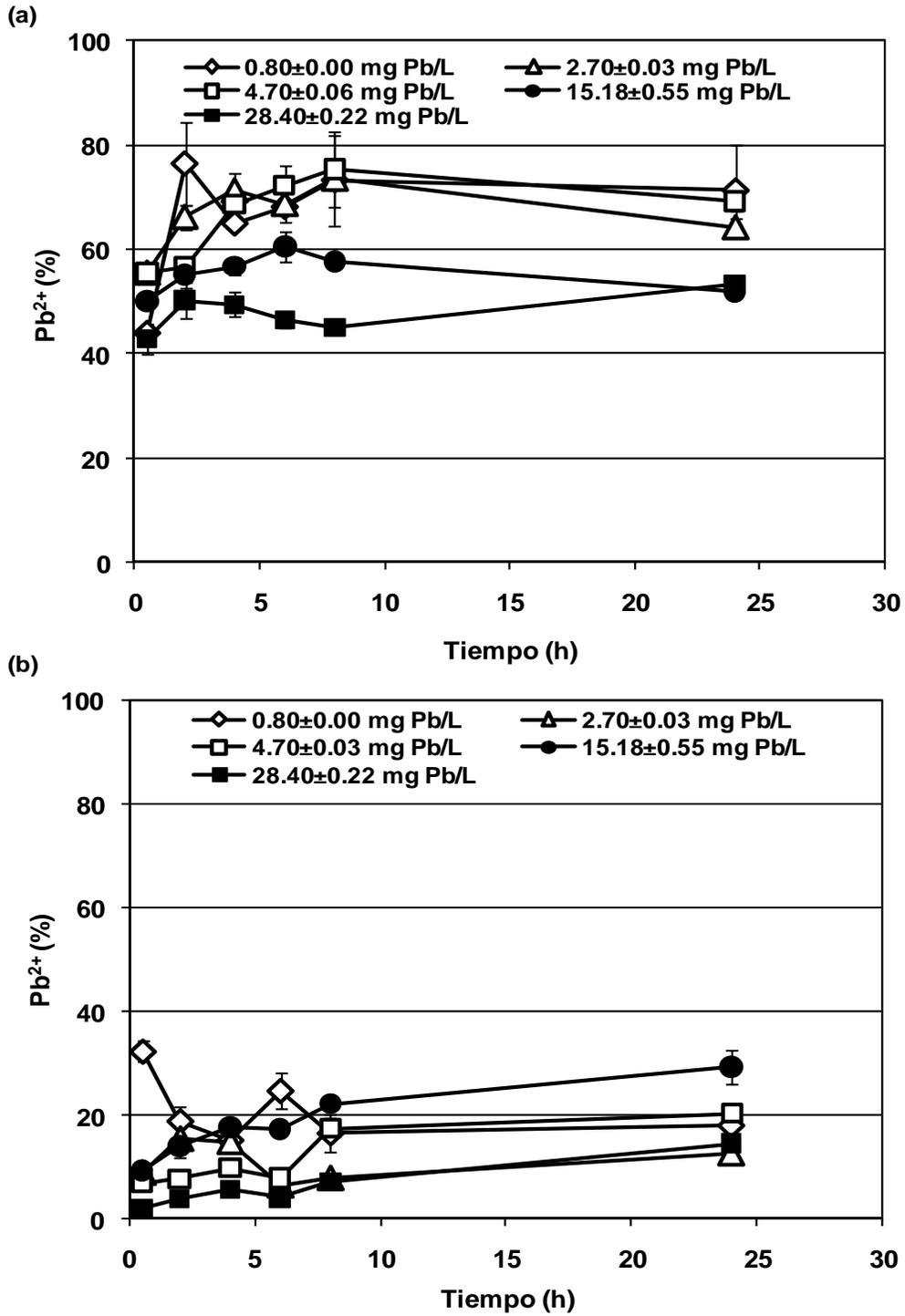


Figura 18. Análisis de compartimentalización de Pb²⁺ en lagunas con *S. minima* operadas por lote usando AD. (a) Pb²⁺ adsorbido y (b) Pb²⁺ acumulado intracelularmente.

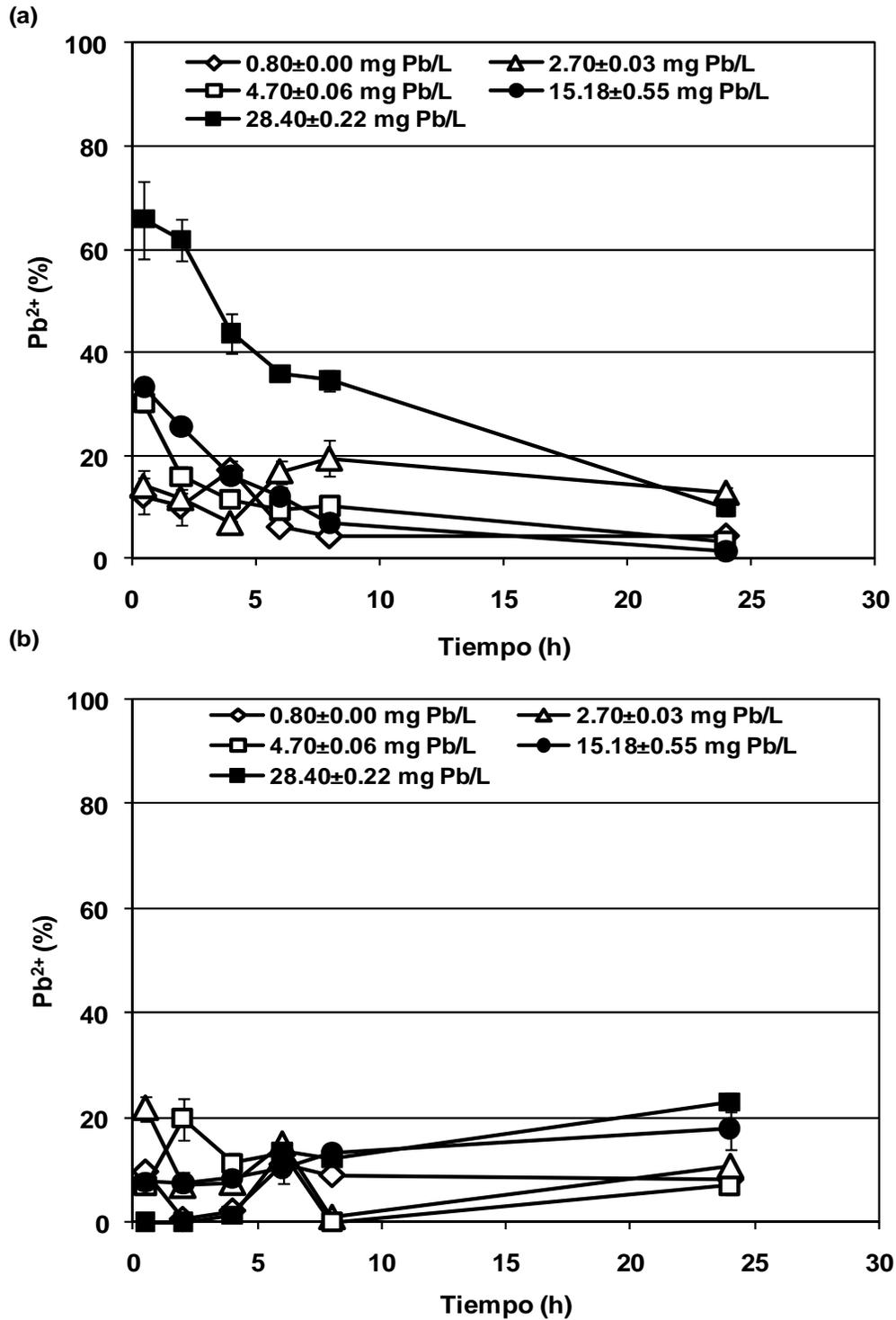


Figura 19. Análisis de compartimentalización de Pb^{2+} en lagunas con *S. minima* operadas por lote usando AD. (c) Pb^{2+} remanente en columna de agua y (d) Pb^{2+} precipitado.

Tal diferencia podría atribuirse a la presencia del cloruro de calcio en el medio Hutner que fue utilizado en el trabajo previo, el cual podría haber bloqueado la entrada de Pb^{2+} a las células, ya que se ha sugerido que el Pb^{2+} es absorbido en las células de *S. minima* a través de transportadores secundarios tales como los canales de calcio (Olgún *et al.*, 2005). Similarmente, se ha encontrado que los iones de Ca^{2+} bloquean el transporte intracelular de Pb^{2+} en la raíz de *Oryza sativa* (Kim *et al.*, 2002). Antosiewicz (2005) también encontró que en plantas tales como *Brassica juncea*, la toxicidad por Pb^{2+} disminuyó a medida que el contenido de Ca^{2+} en el medio aumentó. Se ha descrito que la presencia de Ca^{2+} resulta en una gran disminución en la absorción de metales pesados en raíces de diversas especies de plantas reduciendo de este modo la toxicidad del metal (Seregin y Kozhevnikova, 2009).

6.2.3 Evaluación del Factor de Bioconcentración (FBC), Factor de Adsorción (FAD) y Factor de Acumulación Intracelular (FAI)

Los factores de bioconcentración (FBC) han sido usados para evaluar la capacidad para acumular contaminantes en diversidad de organismos, desde microorganismos hasta vertebrados, incluyendo las plantas (Kahle y Zauke, 2003; Fayiga *et al.*, 2004; Burton *et al.*, 2006). En 1998, Zayed *et al.*, por primera vez, proponen el valor de >1000 para definir a una planta acuática como hiperacumuladora de metales. Anteriormente ya Baker y Brooks (1989) habían

propuesto que una planta terrestre hiperacumuladora debería contener >0.1% de su peso seco en el caso del Pb.

Los FBCs encontrados para *S. minima* bajo todas las condiciones probadas fueron >1000, lo cual confirma la capacidad de *S. minima* para hiperacumular Pb^{2+} en ambos medios (Fig. 20 y Fig. 21). Los FBCs obtenidos cuando se usó el ARS no fueron significativamente diferentes en función del tiempo en las 3 primeras C_i (0.8 ± 0.00 , 2.70 ± 0.03 , 4.70 ± 0.06 mg Pb^{2+}/L) pero sí a las más altas C_i ($p < 0.05$). Únicamente a un tiempo de exposición de 8h se observó una correlación negativa entre la C_i y el FBC ($r^2 = -0.909$). Por el contrario, cuando se usó sólo AD, la ANOVA mostró un efecto combinado del tiempo de exposición y la C_i sobre el valor del FBC ($p < 0.05$) ya que los primeros 30 minutos, los FBCs fueron menores que el resto de los factores calculados a mayores tiempos de exposición. Asimismo, únicamente los FBCs obtenidos a una C_i de 0.8 ± 0.00 mg Pb^{2+}/L fueron mayores que aquellos obtenidos a mayores C_i ($p < 0.05$).

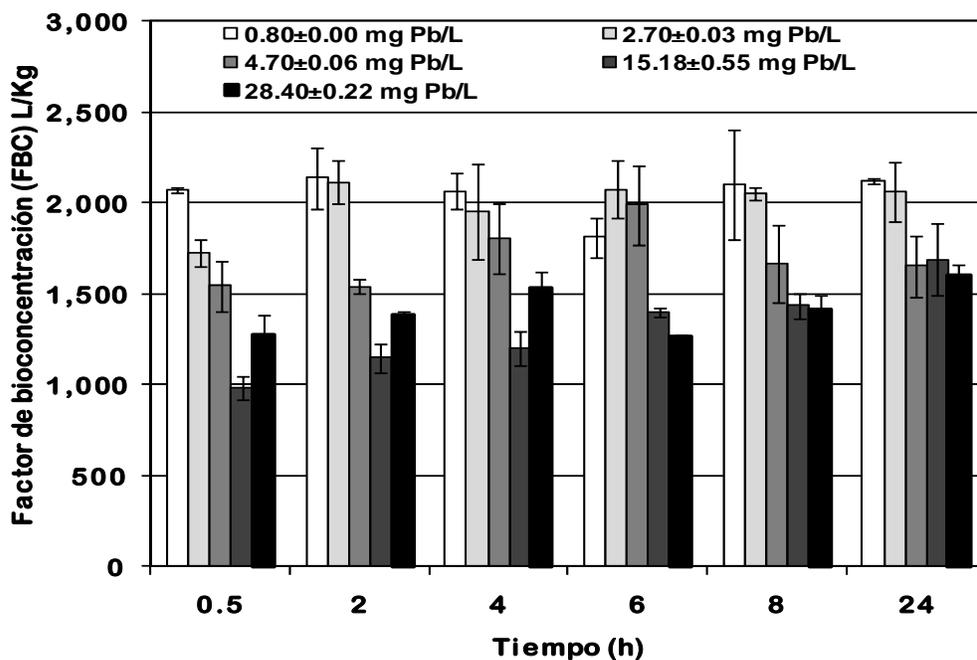


Figura 20. Factor de bioconcentración (FBC) de Pb^{2+} por *S. minima* calculado a diferentes C_i y tiempos de exposición en ARS.

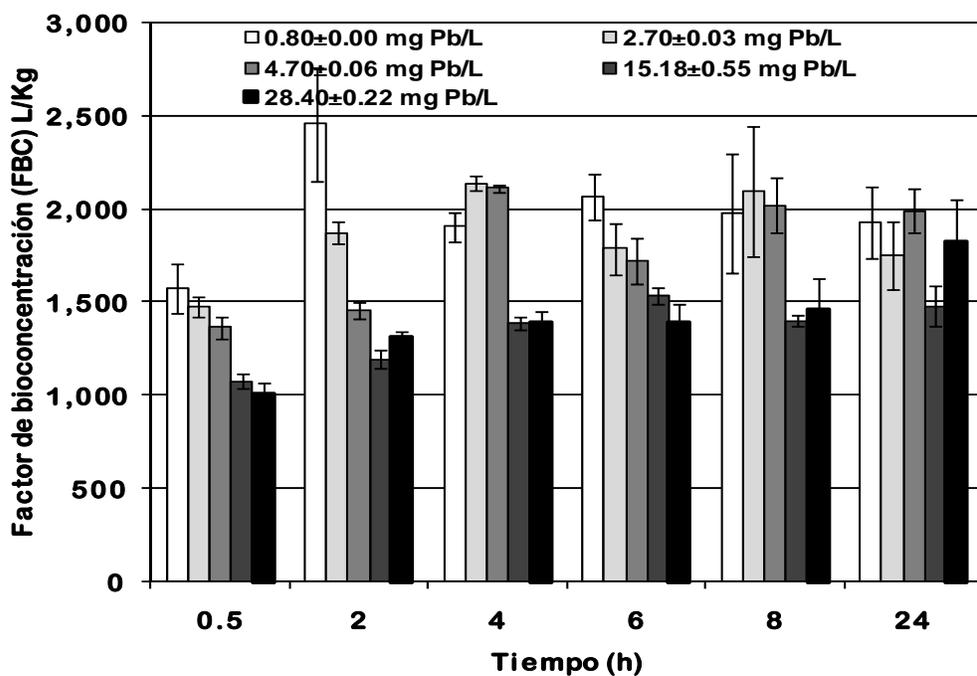


Figura 21. Factores de Bioconcentración (FBC) de Pb^{2+} por *S. minima* calculados a diferentes C_i y tiempos de exposición en AD.

Algunos autores como Wang *et al.* (2002) han sugerido que el valor de FBC >1000 para definir a una planta hiperacumuladora debe ser usado con reserva. Lo anterior debido a que el FBC de Pb encontrado en *E. crassipes* y lemaceas fue 420 y 230, respectivamente a una C_i de 0.1 mg Pb/L, mientras que cuando ésta se incrementó a 10, 20, 40 y 80 mg Pb/L el FBC fue menor a 10. Asimismo, valores bajos similares se han reportado para *Azolla pinnata* después de que fue expuesta a Pb^{2+} durante 24 h (135 y 140 para una C_i de 4 y 8 mg Pb^{2+} /L, respectivamente (Jain *et al.*, 1990). Recientemente, Uysal y Taner (2009) reportaron FBCs de Pb para *L. minor* a diferentes C_i encontrando que, efectivamente, a una C_i muy baja tal como 0.1 mg Pb^{2+} /L el FBC fue 5240 y que cuando la C_i se incrementó a 1, 5 y 10 mg Pb^{2+} /L, el FBC disminuyó considerablemente a 1985, 596 y 385 mg Pb^{2+} /L. De hecho, ya a una C_i de 2.5 mg Pb^{2+} /L el FBC era menor a 1000 (943). Para otras plantas acuáticas tales como *Elodea canadensis*, también se han reportado valores más bajos de los FBCs comparados a aquellos obtenidos con *S. minima* cuando fue expuesta a Pb^{2+} , a una C_i de 1, 10 y 100 mg Pb^{2+} /L, los FBCs encontrados fueron 175, 70 and 10 (Dogan *et al.*, 2009). Por el contrario, los resultados encontrados en el presente trabajo concuerdan con la definición de planta hiperacumuladora en todo el intervalo de C_i probado (0.8 hasta 28.40 mg Pb^{2+} /L) y a diversos tiempos de exposición (0.5 hasta 24 h). Por lo anterior, el problema no es el criterio propuesto por Zayed *et al.* (1998) sino la capacidad de las plantas para hiperacumular Pb^{2+} . De hecho, estos autores también encontraron FBC bajos en lemaceas cuando fueron expuestas a Pb^{2+} (460, 60 y 63 para C_i de 0.1, 1 y 10 mg Pb^{2+} /L, respectivamente) después de 192 h. Así, en este trabajo se

confirma que *S.minima* es hiperacumuladora de Pb^{2+} ya que los FBCs fueron obtenidos a mayores C_i y a diferentes tiempos de exposición que aquellos utilizados previamente (Olguín *et al.*, 2005). Como se discutirá más adelante, esta capacidad hiperacumuladora se debe principalmente a sus características fisicoquímicas tales como su alta superficie específica y contenido de grupos carboxilo. En contraste, aunque no se ha reportado la caracterización de la biomasa de las lemnaceas, sí se sabe que sus frondas no contienen tricomas y que son totalmente aplanadas (Landot, 1986).

Adicional al FBC, se han propuesto diversos factores para evaluar la acumulación de metales en plantas tales como el Factor de Bioconcentración para las raíces ($FBC = C_{\text{metal en raíz}} / C_{\text{metal en suelo/agua}}$) y el FBC para los brotes ($FBC = C_{\text{metal en brotes}} / C_{\text{metal en suelo/agua}}$). Asimismo, para evaluar el transporte interno del metal se ha usado el Factor de Translocación ($FT = C_{\text{metal en brotes}} / C_{\text{metal en raíz}}$) (Marchiol *et al.*, 2004). Sin embargo, no se han propuesto factores para evaluar la capacidad hiperacumuladora de plantas en función de los mecanismos que éstas utilizan para acumular el metal del medio. Por lo anterior, en este trabajo se proponen por primera vez el Factor de Bioadsorción (FAD) y el Factor de Acumulación Intracelular (FAI).

Los resultados indicaron, en congruencia con el análisis de compartimentalización, que el FAD fue mayor al FAI ($p < 0.05$) independientemente de la C_i , del tiempo de exposición y del medio usado y que

(Fig. 22, Fig. 23, Fig. 24, Fig. 25) la capacidad hiperacumuladora de *S. minima* se debe principalmente a la adsorción de Pb^{2+} a su superficie. En la primera media hora, la relación FAD/FAI era igual o mayor que 5 en todas las C_i excepto a la más baja (0.80 ± 0.00 mg Pb^{2+} /L) pero conforme fue avanzando el tiempo de exposición, dicha relación fue disminuyendo en todas las C_i en ambos medios. Esto confirma que en los periodos iniciales la adsorción es muy importante dado que es un proceso rápido, de carácter fisicoquímico mientras aquel de la acumulación intracelular es lento pero se hace más importante a medida que transcurre el tiempo de exposición al metal.

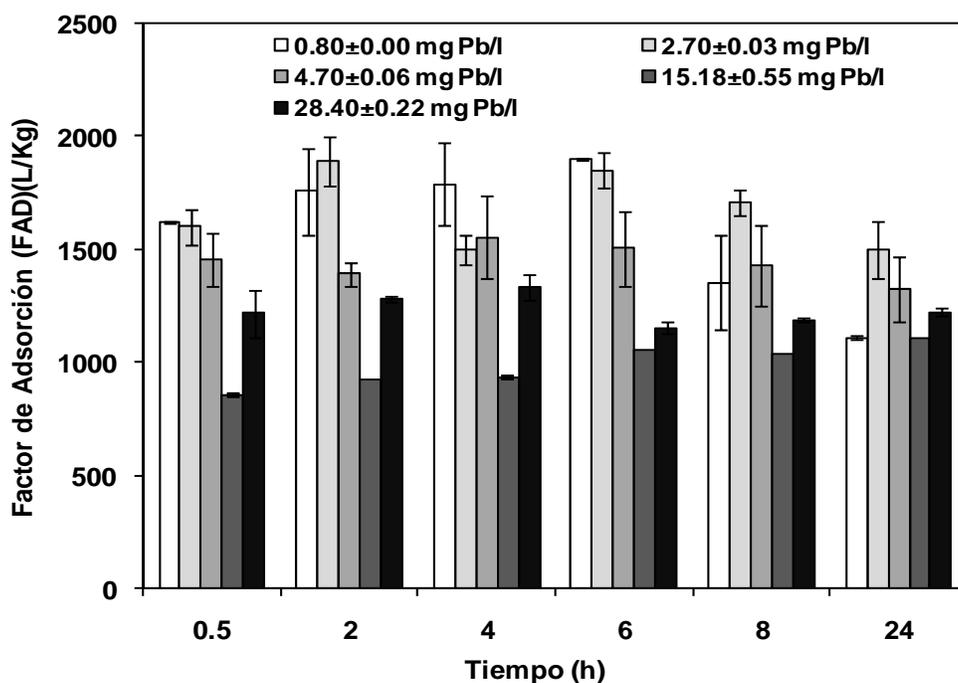


Figura 22. Factores de adsorción (FAD) de Pb^{2+} por *S. minima* calculados a diferentes C_i y tiempos de exposición en ARS.

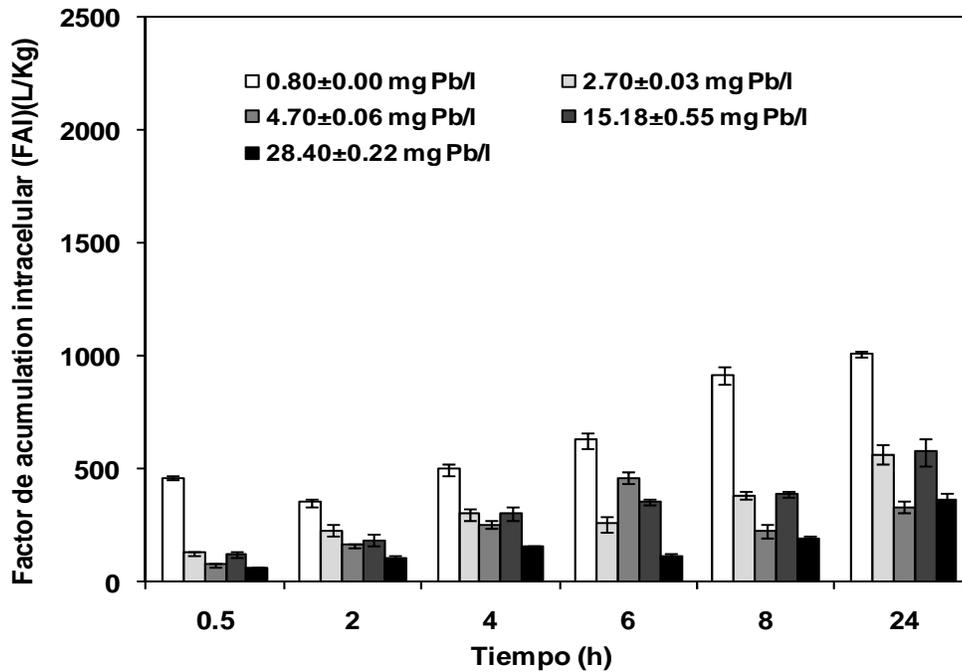


Figura 23. Factores de Acumulación Intracelular (FAI) de Pb^{2+} por *S. minima* calculados a diferentes C_i y tiempos de exposición en ARS.

En términos generales, no se observó un efecto del tiempo de exposición, ni de la C_i sobre el FAD o una correlación entre ellos. Por el contrario, para el caso del FAI sí se observó una correlación entre ésta y el tiempo de exposición ($r^2=0.85-0.98$), pero no así para la C_i , en ARS. Cuando sólo se utilizó AD dicha correlación se encontró a C_i iguales o mayores que 4.70 ± 0.06 mg Pb^{2+}/L ($r^2=0.82-0.96$).

Como se mencionó anteriormente esta es la primera vez que se propone el uso del FAD y FAI para evaluar la capacidad hiperacumuladora de *S. minima* que también pueden ser usados para otras plantas acuáticas flotantes o emergentes.

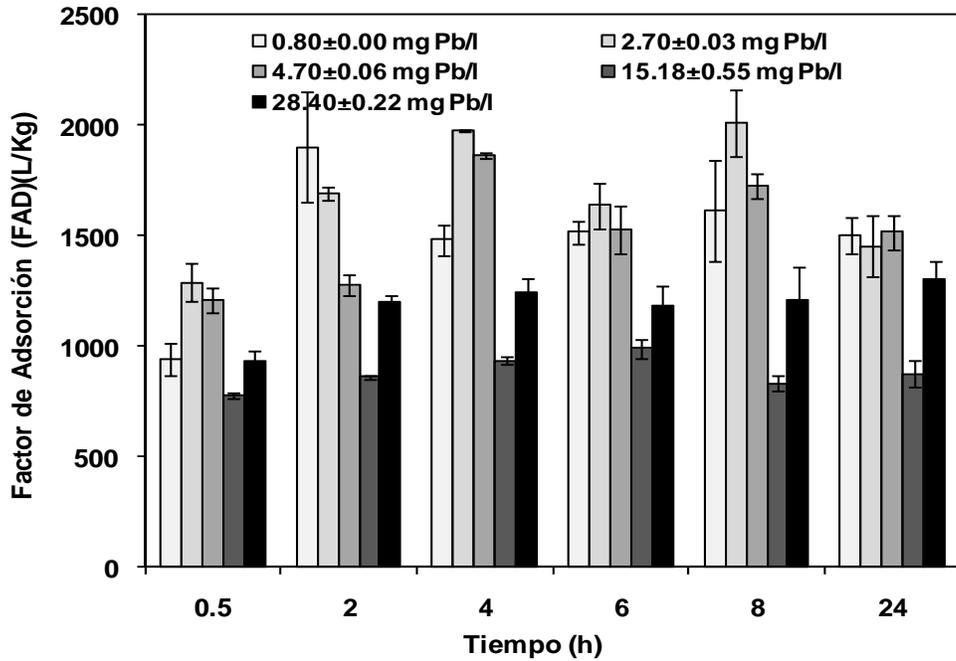


Figura 24. Factores de adsorción (FAD) de Pb^{2+} por *S. minima* calculados a diferentes C_i y tiempos de exposición en AD.

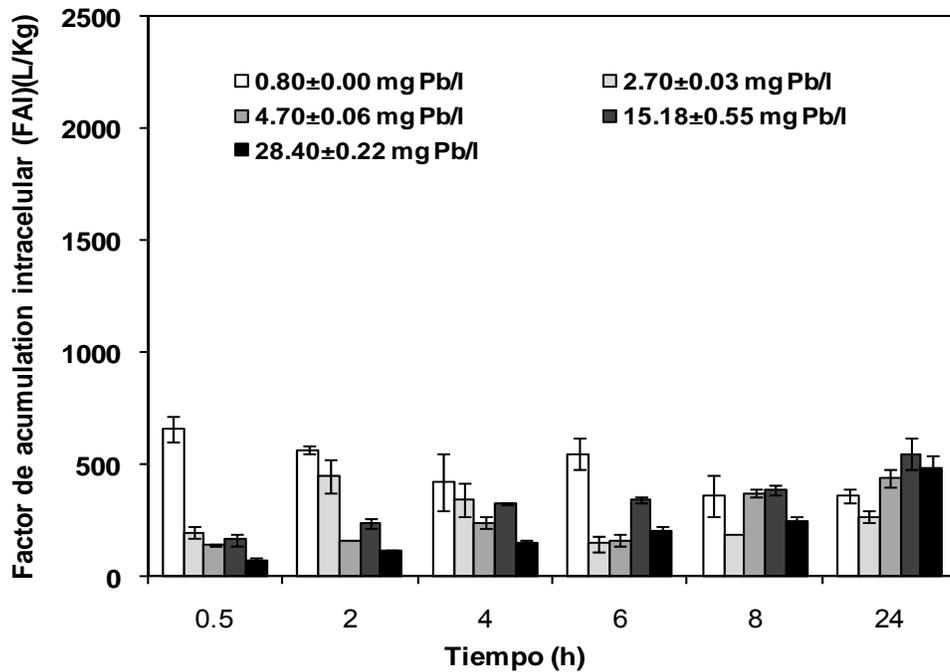


Figura 25. Factores de Acumulación Intracelular (FAI) de Pb^{2+} por *S. minima* calculados a diferentes C_i y tiempos de exposición en AD.

En el caso de las plantas emergentes y aquellas enraizadas cuyas hojas flotan, se han usado algunos otros factores como lo es el factor de translocación para conocer si el metal es transportado del sedimento o de la columna de agua a la raíz y de allí a la parte superior de la planta (Ye *et al.*, 2003; Duman y Obali, 2008). Adicionalmente, Sundberg-Jones *et al.* (2007) reportan el uso de un factor que le denominan factor de superficie de la planta, para evaluar la acumulación de metales en plantas emergentes durante el tratamiento de aguas residuales generadas en la desulfurización de gases de chimenea. Este factor está relacionado a la adsorción del metal a la raíz y los brotes sumergidos que son las partes de la planta que se encontraban en contacto directo con el sedimento y la columna de agua. Este factor lo evaluaron lavando este material vegetal con ácido nítrico. En todos los casos el FBC calculado para As^{3+} (4927 y 766 para *S. californicus* y *T.angustifolia*, respectivamente) fue mayor que el factor de la superficie (111 y 78, para *S. californicus* y *T.angustifolia*, respectivamente). Lo anterior refleja que la translocación juega un papel muy importante en la acumulación de metal en este tipo de plantas.

Recientemente, también en plantas emergentes, Sousa *et al.* (2008) investigaron los mecanismos moleculares y celulares que controlan la acumulación y desintoxicación de metales (Zn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+}) en *Halimione portulacoide* así como la compartimentalización del metal en diferentes órganos y a nivel celular. Para esto, llevaron a cabo una extracción secuencial y los metales fueron cuantificados en los diferentes extractos, etanólico, acuoso, proteico,

péptico, el de los polisacáridos y celulósico. Los resultados mostraron que el Pb^{2+} estaba mayormente unido a compuestos de la pared celular tanto en raíces como en los tallos y las hojas (42-59%) y una cantidad menor se encontraba a nivel intracelular (32-42%). Se ha sugerido que una mayor acumulación de metales a nivel extracelular funciona como una barrera de protección contra efectos dañinos al disminuir la concentración del metal en el citoplasma (Ramos *et al.*, 2002; Zornoza *et al.*, 2002).

6.2.4 Cinética y equilibrio de adsorción de Pb^{2+} en *S.minima*

La bioadsorción es un proceso fisicoquímico y una propiedad tanto de la biomasa viable como de la no viable y ha sido postulada desde hace años como una biotecnología prometedora para la eliminación de contaminantes de soluciones debido a su simplicidad, eficiencia y por la disponibilidad de biomasa (Gadd, 2009). La mayoría de los reportes sobre adsorción de metales está relacionada a distintos tipos de biomasa no viable, no obstante también es relevante entender la adsorción en biomasa viable dado que representa uno de los principales mecanismos de eliminación de metales en plantas.

En este trabajo se evaluó el perfil de la adsorción de Pb^{2+} por *S. minima*, a diferentes C_i y a diferentes tiempos de exposición en los dos diferentes medios (ARS y AD) (Fig. 26 y Fig. 27). Lo más relevante que se encontró fue la relación altamente positiva entre la cantidad de Pb^{2+} adsorbido a la superficie de la planta

(q) y la C_i ($r^2=0.9815$), ya que a medida que incrementó la C_i , una mayor cantidad del metal se encontró adsorbida, especialmente cuando la C_i cambió de 15.18 ± 0.55 a 28.40 ± 0.22 mg Pb^{2+} /L (2.54 y 2.66 veces para ARS y AD, respectivamente) ($p<0.05$).

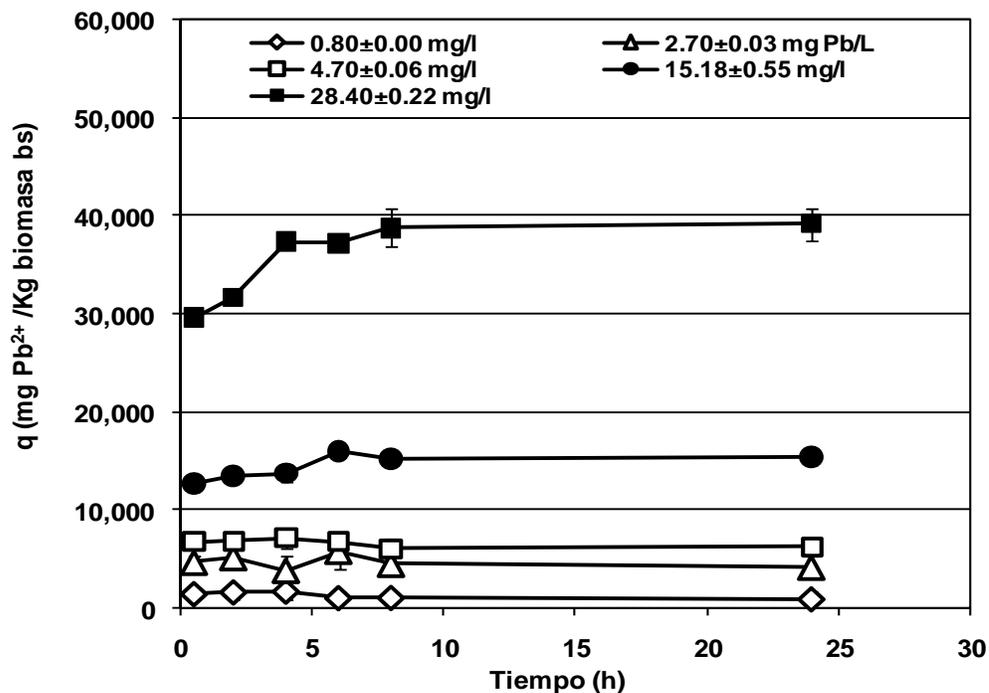


Figura 26. Adsorción de Pb^{2+} por *S. minima* a diferentes C_i y tiempos de exposición en ARS

Lo anterior indicaría que aún utilizando la más alta C_i habría no se habrían llegado a saturar los sitios de unión para el ión metálico en la superficie de *Salvinia*. Asimismo, los resultados indicaron que la capacidad de adsorción de la planta fue un proceso muy rápido. De hecho, en el caso de las más bajas C_i probadas no hubo cambios significativos en la q después de los primeros 30 minutos. Por el

contrario, a las mayores C_i (15.18 ± 0.55 y 28.40 ± 0.22 mg Pb/L), el contenido de Pb^{2+} adsorbido incrementó de 0.5 a 24 h ($p < 0.05$) en el caso de ARS (Fig. 28). Contrariamente, en AD sí hubo un incremento en la adsorción de Pb^{2+} después de las 0.5 h en todas las C_i probadas ($p < 0.05$) (Fig. 29).

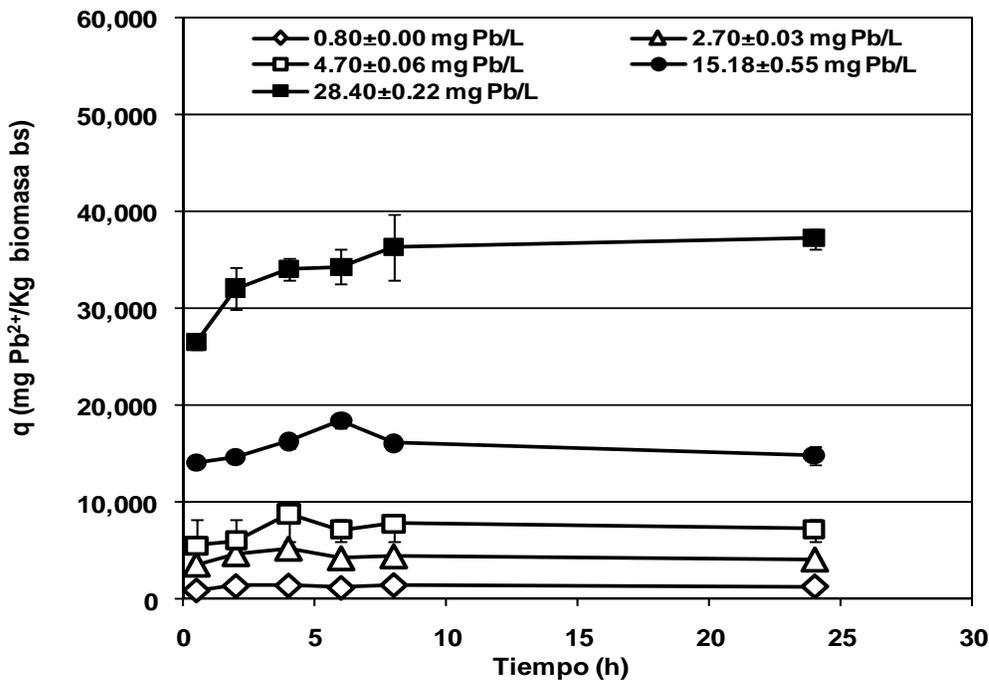


Figura 27. Adsorción de Pb^{2+} por *S. minima* a diferentes C_i y tiempos de exposición en AD.

En otras plantas acuáticas como *Potamogeton pectinatus* y *Potamogeton malaianus* (Peng *et al.*, 2008) se han reportado cantidades menores de Pb^{2+} (3,030 y 2,550 mg/kg, respectivamente) que las encontradas en *S. minima* ($6,384.80 \pm 530$ mg/kg) para una de C_i similar (5.39 y 4.70 mg/L, respectivamente) en un periodo de 2 h. Asimismo, Benaroya *et al* (2004) encontraron, en otro helecho acuático como *Azolla filicuoides*, cantidades de 4,000 mg Pb/kg al

exponer la planta al metal durante 2 días a una C_i de 20 mg Pb^{2+} /l mientras que en *S. minima* la concentración obtenida fue de $15,099 \pm 419$ mg Pb^{2+} /kg a una C_i y un tiempo de exposición menor (15.18 ± 0.55 mg Pb^{2+} /L y 1 día, respectivamente).

A las 24 h, el contenido promedio de Pb^{2+} adsorbido alcanzó un valor alto de $3.81 \pm 0.13\%$ b.s. a una C_i de 28.40 ± 0.22 mg Pb /L, el cual es mayor al encontrado para otros hiperacumuladores tales como *Sesbania drummondii* (2%, en raíces) y *Fagopyrum esculentum* (1.7%) (Sahi *et al.* 2002; Tamura *et al.* 2005). De la misma manera, dicho valor es mucho mayor al reportado para *Lemna polyrrhiza* cuando fue expuesta a Pb^{2+} durante 6 días a una C_i de 30 mg Pb /L (0.025%) (John *et al.*, 2008). Lo anterior, refleja la gran capacidad de la biomasa de *S. minima* para adsorber el metal lo que podría deberse a sus características fisicoquímicas descritas previamente, específicamente a su alta superficie específica y a la cantidad de grupos carboxilo. Se ha descrito que los grupos funcionales responsables de la adsorción de metales son aquellos que se encuentran en la pared celular e incluyen los grupos carboxilo, hidroxilo, sulfato, sulfhidrilo, fosfato, amino, amida, imina e imidazol (Demirbas, 2008; Gardea-Torresdey *et al.*, 2004), dentro de los cuales el grupo carboxilo y el grupo fosfato son los que directamente afectan la capacidad de adsorción de la biomasa (Rakhshae *et al.*, 2009).

Se han descrito diversos modelos para estudiar la cinética y equilibrio de adsorción de metales en diferentes materiales (Gavrilescu, 2004, Ho y MacKay, 1999). Estos también son útiles para predecir los mecanismos de enlace entre el

metal y la biomasa así como la capacidad máxima de adsorción. En el presente trabajo, se investigó sobre la cinética de adsorción de Pb^{2+} en la biomasa utilizando los dos modelos más comunes, el de primer orden (llamado también modelo de Lagergren) y el de segundo orden. Para el modelo de primer orden y en las C_i más pequeñas (0.8 ± 0.00 , 2.70 ± 0.03 y 4.70 ± 0.06 mg Pb^{2+}/L), el coeficiente de determinación fue muy bajo ($r^2=0.521-0.597$). Lo anterior probablemente debido a que la cantidad de Pb^{2+} adsorbido no cambió significativamente desde las 0.5 hasta las 24 h, por lo que la diferencia entre q_e y q_t tendió a cero y el valor de $\ln(q_e - q_t)$ fue negativo. Por el contrario, los datos de las C_i más altas (15.18 ± 0.55 y 28.40 ± 0.22 mg Pb^{2+}/L) se ajustaron mejor al modelo ($r^2=0.717-0.859$) tal vez consecuencia de que se encontraron diferencias mayores entre q_e y q_t , en comparación a aquellas de las C_i más bajas.

Cuando se probó el modelo de segundo orden se obtuvieron altos coeficientes de determinación ($r^2 > 0.997$) con altos niveles de probabilidad ($p < 0.01$) en todos los casos probados (Tabla 4). Resultados similares fueron encontrados en la cinética de adsorción de Pb^{2+} por biomasa no viable de *Azolla filiculoides* pre-tratada con NaOH, obteniendo un mayor r^2 en el modelo de segundo orden (0.999 vs 0.78) (Rakhshae et al., 2006). También Keskinan et al. (2004) encontraron que en la adsorción de Pb^{2+} , por *Ceratophyllum demersum*, la ecuación de primer orden no fue apropiada para todos los resultados, sólo para algunos datos. La ecuación de segundo orden por el contrario, sí fue aplicable para todos los datos ($r^2=0.999$).

Asimismo, Freitas *et al.* (2008) obtuvieron una mayor precisión cuando usaron el modelo de segundo orden al evaluar la cinética de adsorción de Pb^{2+} por biomasa de macroalgas cafés (*Sargassum muticum*, *Fucus spiralis*, *Bifurcata bifurcata*). En el modelo de segundo orden, la etapa limitante de la velocidad es la quimiosorción (Aksu, 2001). Por lo anterior, parece factible predecir que el mecanismo de adsorción de Pb^{2+} en *S. minima* ocurre principalmente por reacciones de intercambio iónico entre los iones de Pb^{2+} y los grupos débiles de intercambio. De hecho, se ha reportado que iones tales como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{+2} , Fe^{3+} and Mn^{2+} son liberados a la solución acuosa durante la adsorción de Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} por biomasa de plantas acuáticas tales como *Spirodela intermedia* (Miretzky *et al.* 2006), *E. crassipes*, *Valisneria spiralis*, *P. stratiotes* (Verma *et al.*, 2008) y *Potamogeton lucens* (Schneider y Rubio 1999).

Las velocidades de adsorción inicial (h) encontradas en el presente trabajo fueron afectadas por la C_i ya que incrementaron gradualmente al aumentar la C_i en ARS ($p < 0.05$). En AD, la h incrementó en bloques, el primero de 0.8 y 2.70 mg Pb^{2+} /L, el segundo de 4.70 y 15.18 mg Pb^{2+} /L y el tercero de 28.40 mg Pb^{2+} /L. Por el contrario, la constante de velocidad (k_2) decreció claramente cuando la C_i incrementó de 0.8 ± 0.0 a 2.70 ± 0.03 mg Pb^{2+} /L ($p < 0.05$).

Tabla 4. Constantes del modelo de la cinética de pseudo-segundo orden para la adsorción de Pb²⁺ por *S. minima*.

C _i (mg Pb ²⁺ /L)	ARS					AD				
	q _e (mg/g)	k ₂ (g/mg h)	h (mg/g h)	r ²	p	q _e (mg/g)	k ₂ (g/mg h)	h (mg/g h)	r ²	p
0.80±0.00	0.76±0.01 ^a	1.31±0.08 ^a	0.76±0.07 ^a	0.998	<0.001	1.27±0.049 ^a	4.91±0.22 ^a	7.94±0.24 ^a	0.998	<0.001
2.70±0.03	3.98±0.25 ^b	0.46±0.002 ^b	7.36±0.98 ^b	0.997	<0.001	3.90±0.07 ^b	0.55±0.02 ^b	8.44±0.05 ^a	0.999	<0.001
4.70±0.06	5.81±0.047 ^c	0.48±0.08 ^b	16.23±2.57 ^c	0.999	<0.001	6.90±0.33 ^c	0.81±0.14 ^b	38.44±3.12 ^b	0.999	<0.001
15.18±0.55	15.95±0.70 ^d	0.21±0.01 ^c	52.80±1.77 ^d	0.999	<0.001	13.55±0.94 ^d	0.19±0.03 ^c	41.13±4.40 ^b	0.999	<0.001
28.40±0.22	38.61±0.42 ^e	0.10±0.01 ^d	160.39±12.87 ^e	0.999	<0.001	38.03±0.86 ^e	0.06±0.011 ^d	85.79±10.84 ^c	0.999	<0.001

ARS=agua residual sintética AD= agua desionizada

Los valores promedio con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0.05)

Entre esta última y 4.70 ± 0.06 mg Pb^{2+}/L , no hubo diferencias significativas en ambos medios pero posteriormente conforme se fue incrementando la C_i , la k_2 fue disminuyendo. Ambas velocidades (h y k_2) calculadas en ARS fueron mayores a aquellas obtenidas en AD ($p < 0.05$) a la más alta C_i .

Finalmente, la adsorción en el equilibrio calculada también fue afectada positivamente por la C_i ($p < 0.05$) en ambos medios, lo cual refleja la gran capacidad de la biomasa de *S. minima* para adsorber el metal independientemente de la adición de otros compuestos orgánicos e inorgánicos como los adicionados en el ARS.

Las velocidades de adsorción obtenidas para *S. minima* son menores a las encontradas para la adsorción de Pb^{2+} por *C. demersum* (Keskinan *et al.*, 2004). La velocidad inicial (h) encontrada a 15.18 mg Pb^{2+}/L en AD fue 41.31 ± 4.40 mientras que para *C. demersum* fue 90.36 mg/gh a una C_i de 10 mg Pb^{2+}/L . Asimismo, la velocidad específica de adsorción fue cuatro veces más pequeña en *S. minima* en comparación con *C. demersum* (0.21 vs 0.88 g/mg h, respectivamente). Lo anterior podría deberse a que, a diferencia de los experimentos desarrollados en el presente trabajo, aquellos con *C. demersum* se realizaron en matraces de 250 ml con agitación orbital lo que pudo haber provocado una mayor difusión del metal en el medio. De hecho, se ha encontrado que la agitación ejerce un efecto positivo sobre la adsorción de Pb^{2+} en *A. filiculoides* ya que incrementó un 35% cuando fue agitada entre 150 - 2000 rpm, en

comparación a cuando no lo fue (Khosravi *et al.*, 2005). Los autores mencionan que a esa velocidad de agitación se aseguró que todos los sitios disponibles de la pared celular de las células estuvieran disponibles para la acumulación del metal, de tal manera que el efecto de la difusión externa sobre la velocidad de adsorción podía ser ignorada en cualquier análisis ingenieril. También encontraron que a velocidades tan altas como 500 rpm disminuyó la adsorción posiblemente debido a la desorción del metal.

Asimismo, velocidades específicas similares (k_2) a las obtenidas en *S. minima*, a una C_i de 15.18 ± 0.55 mg Pb/L, se encontraron en la adsorción de Pb^{2+} por biomasa no viable de *A. filiculoides* (0.21 h^{-1}) aunque una C_i mucho mayor (207 mg Pb/L) (Rakhshaei *et al.*, 2006). El hecho de haber obtenido una alta k_2 a una C_i tan grande podría explicarse en base a la no viabilidad de la biomasa ya que no sufre los efectos tóxicos del metal y puede adsorber una mayor cantidad de metal, además de que la cantidad de biomasa utilizada de *A. filiculoides* fue mayor a la utilizada con *S. minima* (2 vs 0.7383 gbs/L, respectivamente). Finalmente, se ha reportado una velocidad inicial (h) similar a la encontrada en *S. minima* a la mayor C_i (160.39 ± 12.87 mg/g h para AD) en la adsorción de biomasa no viable del alga café *Lobophora variegata* (157.17 mg/g h) usando una densidad de biomasa de 2 g/L pero a una C_i mucho mayor (414 mg Pb/L). Sería de esperarse que la h fuera mayor al tener una mayor C_i , sin embargo los autores encontraron que la difusión intrapartícula retardó el proceso de adsorción del metal (Jha *et al.*, 2009).

Por otro lado, cuando una masa adsorbente y una solución están en contacto por un tiempo suficientemente largo, se desarrolla o alcanza un equilibrio entre la cantidad de metal adsorbido y la cantidad del mismo remanente en la solución. Los modelos o isotermas de adsorción han sido usados para predecir la habilidad de ciertos adsorbentes para eliminar contaminantes de soluciones o aguas residuales. Los datos de adsorción de un amplio intervalo de concentraciones de adsorbatos (metal) son convenientemente descritos por isotermas tales como los de Langmuir o Freundlich (Demirbas, 2008). Los datos de adsorción del presente trabajo se analizaron utilizando las isotermas mencionadas. De acuerdo a los resultados obtenidos, el equilibrio se alcanzó a las 6h de haber expuesto la planta a la solución con el metal. Los datos se ajustaron bien a ambas isotermas con altos coeficientes de determinación ($r^2 > 0.95$) (Tabla 5). Todos los parámetros de ambos modelos (q_{max} , $1/b$, K y n) fueron significativamente mayores cuando el Pb^{2+} fue adsorbido en un medio adicionado con ácido propiónico y sulfato de magnesio ($p < 0.05$). Lo anterior podría estar relacionado a una mayor biodisponibilidad del metal debido a la presencia de compuestos lábiles que pudieron haberse formado por la presencia del ácido propiónico tal como el propionato de plomo. Comúnmente, la predicción de la biodisponibilidad del metal considera al ión libre como la especie mayormente disponible. Sin embargo, se ha reportado que hay incrementos en la disponibilidad del metal en la presencia de complejos de metal de fácil disociación (i.e. lábiles) que se forman con ligandos sintéticos o naturales (Slaveykova y Wilkinson 2002; Degryse *et al.*, 2006). Así, bajo las condiciones usadas en el presente trabajo, complejos de propionato de plomo pudieron

haberse formado en la solución y contribuir a un mayor abastecimiento de plomo a la superficie de *S. minima*. Al respecto, Chen y Wu (2004) encontraron que la capacidad máxima de adsorción (q_{max}) de Cu^{2+} por un adsorbente (carbón activado más ácidos húmicos) fue mayor cuando en la solución estaba presente ácido cítrico (8.42 vs. 4.83 mg/g).

Tabla 5. Parámetros del equilibrio de adsorción de Pb^{2+} por *S. minima* de acuerdo a las isothermas de Freundlich y Langmuir.

Medio	Freundlich			Langmuir		
	$K(mg/g)(L/mg)^{1/n}$	n	r^2	$q_{max} (mg/g)$	$b (L/mg)$	r^2
ARS	9.57 ± 0.12^a	1.77 ± 0.081	0.985	58.20 ± 1.45^a	0.14 ± 0.007	0.954
AD	8.31 ± 0.18^b	1.57 ± 0.108	0.951	44.15 ± 2.55^b	0.29 ± 0.011	0.988

ARS=agua residual sintética AD= agua desionizada

Los valores promedio con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Es escasa la literatura sobre la evaluación del equilibrio de adsorción de metales en biomasa viable de macrófitas. La q_{max} obtenida en ARS (58.20 ± 1.45 mg/g) es ligeramente superior a la encontrada por Wang *et al.*, (1996) (55 mg/g) para la adsorción de Pb^{2+} por la planta acuática *Myriophyllum spicatum*. Aunque, posteriormente Keskinan *et al.* (2003, 2007) han reportado una q_{max} más baja

para la misma planta (46.69 y 46.49 mg/g). La q_{\max} obtenida en el presente trabajo en AD (44.15±2.55 mg/g) es similar a la calculada para *Ceratophyllum demersum* (44.80 mg/g) (Keskinan *et al.*, 2007). Capacidades mayores de adsorción de Pb^{2+} se han encontrado en biomasa no viable de plantas acuáticas sumergibles tales como *Potamogeton lucens* (141 mg/g) (Schneider y Rubio, 1999) e *H. verticillata* (104.20 mg/g) (Huang *et al.*, 2009). Lo anterior puede ser debido a que dichas plantas tienen una superficie específica mayor a la de *S. minima* (264 m²/g) como es el caso de *P. lucens* (415 m²/g) (Schneider y Rubio, 1999). En el caso de biomasa no viable de plantas acuáticas flotantes se han encontrado valores menores tales como para *L. minor* (27.10 mg/g) (Elmaci *et al.*, 2009). En cuanto a la capacidad de adsorción calculada en el modelo de Freundlich, los valores encontrados fueron mayores a los encontrados para biomasa no viable de *P. stratiotes* (1.03 L/g) (Verma *et al.*, 2008) pero menores a los obtenidos para la adsorción de Pb^{2+} usando biomasa seca de *S. intermedia* y *L. minor* en un sistema multimetal (166.49 y 447.92 L/g, respectivamente) Miretzky *et al.*, 2006).

6.2.5 Acumulación intracelular de Pb^{2+} en *S. minima*

Los iones metálicos penetran en las plantas principalmente a través del sistema radicular en donde la mayor cantidad de metal se encuentra unido a la pared celular (Antosiewicz, 2005). En ésta los polisacáridos, celulosa, lignina y hemicelulosa juegan un papel especial en la quelación de estos metales debido a su contenido de grupos carboxilo, hidroxilo, sulfato, sulfhidrilo, fosfato, amino, etc., los cuales son los grupos enlazantes de metales (Seregin e Ivanov, 2001; Gardea-

Torresdey *et al.*, 2004; Marmiroli *et al.* 2005; Polec-Pawlak *et al.* 2007). Sin embargo, parte del Pb^{2+} también puede penetrar a la célula (Samardakiewicz y Wozny, 2000).

En el presente trabajo se encontró que el Pb^{2+} es acumulado a nivel intracelular en *S. minima* en todo el intervalo de C_i probado. El contenido de Pb^{2+} acumulado en las células de la planta fue afectado positivamente por la C_i especialmente cuando la C_i aumentó de 4.70 ± 0.06 a 15.18 ± 0.55 y a 28.40 ± 0.22 mg Pb^{2+} /L ($p < 0.05$) (Fig. 28 y Fig. 29). El contenido de Pb^{2+} en la biomasa expuesta a la más alta C_i fue casi 10 veces mayor a aquella observada a la más baja C_i ($p < 0.05$) durante las primeras 4 h en ambos medios (4226.50 ± 230 vs. 450 ± 70 and 4243 ± 660 vs. 320 ± 20 mg Pb^{2+} /kg biomasa bs para ARS y AD, respectivamente).

La correlación encontrada entre la C_i y la cantidad de Pb^{2+} acumulado fue muy alta sobre todo después de 24 h de exposición ($r^2 = 0.959$ y 0.986 para ARS y AD, respectivamente) ($p < 0.01$). Asimismo, se observó un efecto del tiempo sobre la cantidad de Pb^{2+} que penetró en las células, particularmente en las C_i iguales o mayores a 4.70 ± 0.06 mg Pb^{2+} /L ($p < 0.05$). En éstas se observó un incremento entre 10 y 30% de Pb^{2+} acumulado después de exponer la planta al metal durante 1 día.

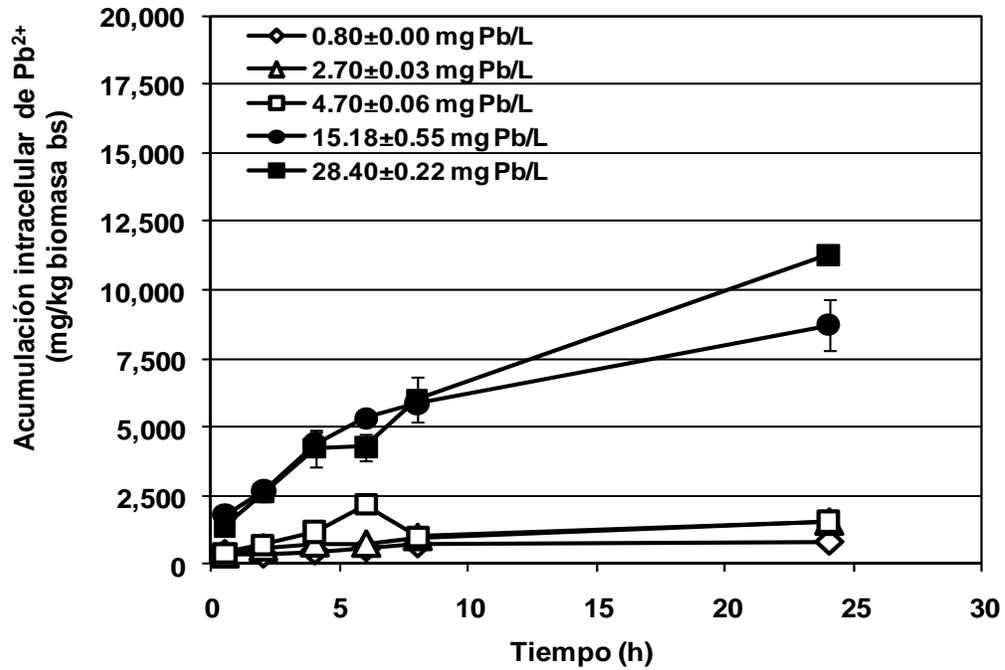


Figura 28. Acumulación intracelular de Pb²⁺ en *S. minima* a diferentes C_i del metal en agua residual sintética (ARS).

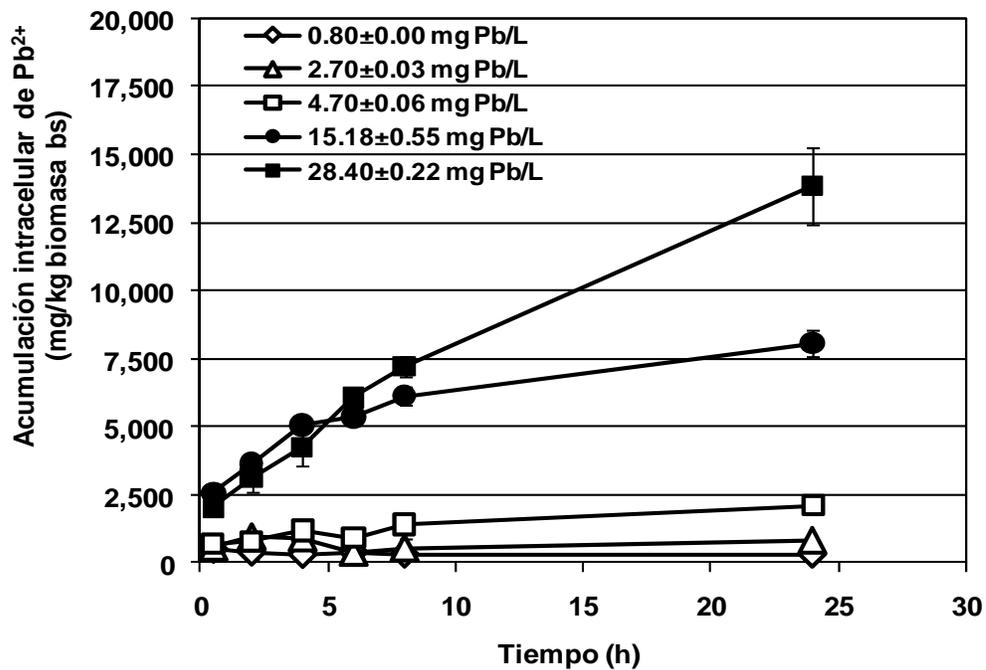


Figura 29. Acumulación intracelular de Pb²⁺ en *S. minima* a diferentes C_i del metal en agua desionizada (AD).

Los altos contenidos de Pb^{2+} encontrados ($1.12 \pm 0.081\%$ en ARS y $1.38 \pm 0.14\%$ en AD) para una C_i de 28.40 ± 0.22 mg Pb^{2+}/l son similares a aquellas reportados para los brotes de *S. drummondii* ($1.25 \pm 0.18\%$ bs) expuestos en hidroponia a una C_i mayor (156 mg Pb^{2+}/L) durante dos semanas (Sahi *et al.*, 2002). No se encontró un efecto del tipo de medio sobre la cantidad de Pb^{2+} acumulado. La alta capacidad de *S. minima* para acumular Pb^{2+} puede ser atribuida a la síntesis de tioles (FQs y GSH). Estrella-Gómez *et al.*, (2009) reportaron que el Pb^{2+} induce la producción de FQs (2, 3 y especialmente 4) y que éstas pueden estar involucradas en la desintoxicación de Pb^{2+} como parte de un mecanismo que tolera el metal. Sin embargo, dichos resultados no responden a lo encontrado en este trabajo de tesis ya que se debe demostrar que la producción de tioles es responsable de la capacidad para acumular Pb^{2+} a nivel intracelular, dado que dichos autores sólo trabajaron con una concentración inicial de Pb^{2+} (8.13 mg Pb^{2+}/L). Por el contrario, Mishra *et al* (2006) evaluaron en *Ceratophyllum demersum*, una planta acuática, la producción de FQs a diferentes concentraciones iniciales de Pb^{2+} en el medio y encontraron que la concentración de FQ2, incrementó a medida que la concentración del metal fue incrementada de 2.19 a 10.98 mg Pb^{2+}/L .

Después de 24 h de exposición al metal, *S. minima* no mostró signos visibles de toxicidad en todas las C_i probadas excepto a las más alta C_i , en la cual algunas frondas se tornaron color café en ARS (Fig. 30).



Figura 30. *S. minima*
expuesta a 28.40 ± 0.22 mg
 Pb^{2+} /L en ARS durante 24 h

La velocidad a la cual se desarrolló la acumulación intracelular fue afectada positivamente por la C_i especialmente cuando ésta se incrementó a 15.18 ± 0.55 y 28.40 ± 0.22 mg Pb^{2+} /L en ambos medios (Fig.31 y Fig.32) ($p < 0.05$), ya que claramente se observaron dos grupos, las velocidades encontradas a alta y baja C_i . Los valores promedio obtenidos en las C_i de 0.8 ± 0.0 , 2.70 ± 0.03 y 4.70 ± 0.06 mg Pb^{2+} /L fueron 0.7695 ± 0.036 (ARS) y 1.2054 ± 0.118 mg Pb/g biomasa h (AD), mientras que en las C_i más altas se alcanzaron valores de hasta 3.1875 ± 0.623 y 4.633 ± 0.735 mg Pb^{2+} /g biomasa h, para ARS y AD respectivamente. También se encontró que dichas velocidades disminuyeron conforme se incrementó el tiempo de exposición ($p < 0.05$) específicamente de las 0.5 a las 8 h ya que posteriormente, de las 8 a las 24 h, no hubo cambios significativos en todas las C_i y en ambos medios.

Finalmente se observó que en los primeros minutos las velocidades calculadas para AD fueron mayores que aquellas encontradas en ARS ($p < 0.05$), lo que sugiere que el sulfato de magnesio y el ácido propiónico podrían haber tenido un efecto negativo sobre la velocidad con la cual el Pb^{2+} entró a la célula. Sin embargo pareciera que dicho efecto se diluyó con el tiempo dado que al final del periodo de prueba los valores de ambos medios fueron muy similares.

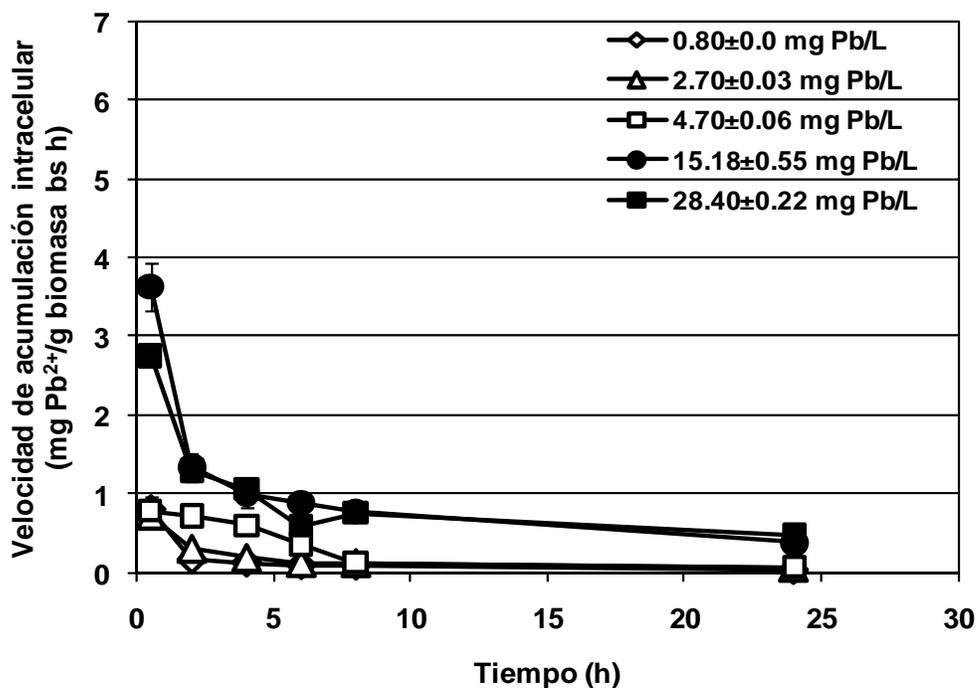


Figura 31. Velocidad de acumulación intracelular de Pb^{2+} en *S. minima* en ARS

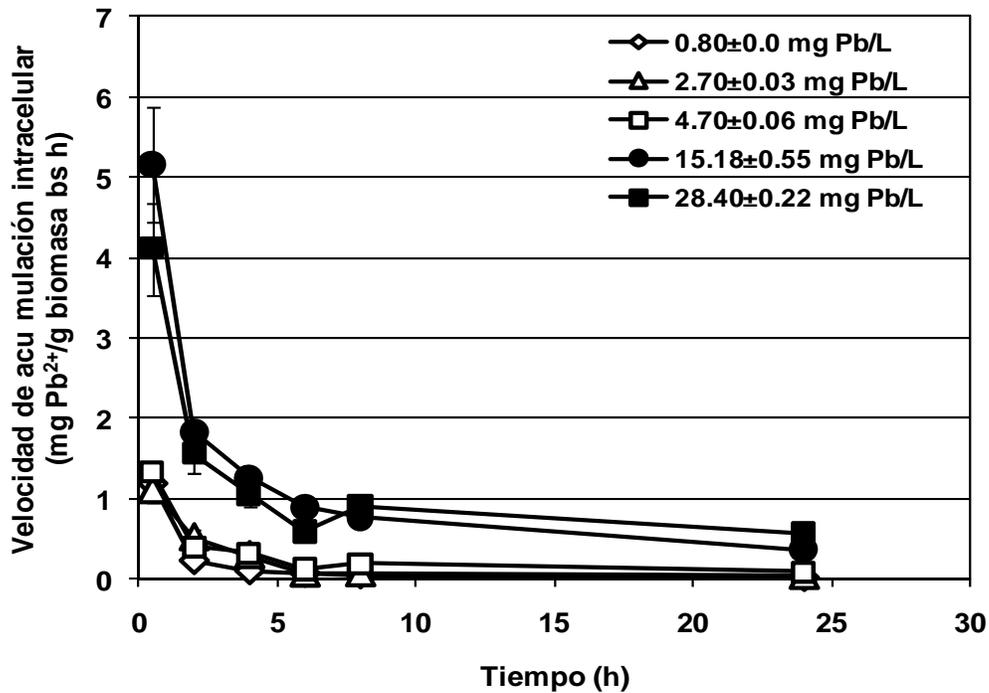


Figura 32. Velocidad de acumulación intracelular de Pb^{2+} en *S. minima* en AD.

El modelo de Michaelis–Menten ha sido usado para inferir el mecanismo responsable del transporte de metales a través de la membrana plasmática (Abedin *et al.* 2002). En el presente trabajo las velocidades de la acumulación intracelular de Pb^{2+} , obtenidas a las 4 h en todo el intervalo de C_i probado, se analizaron de acuerdo al modelo de Michaelis–Menten y se obtuvo un ajuste aceptable al mismo, tanto en ARS como en AD (Tabla 6). El ajuste de los datos a este modelo sugiere que el Pb^{2+} es transportado al interior de las células a través del transporte activo (i.e. transportadores de membrana) y/o por difusión facilitada (canales iónicos).

Se ha demostrado que elementos no esenciales tales como el Cd^{2+} y Pb^{2+} usan canales y transportadores de la membrana plasmática que normalmente funcionan en la acumulación de iones esenciales tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Clemens, 2001). Lo anterior se ha estudiado principalmente en plantas terrestres. Sunkar *et al.* (2000) han sugerido que la proteína NtCBP4 de la planta de tabaco y la proteína AtCNGC1 de *Arabidopsis* son componentes del transporte de entrada de Pb^{2+} en células de plantas. También se ha encontrado que la acumulación acelerada de Pb^{2+} (usando ácidos orgánicos) es parcialmente mediada por canales de Ca^{2+} y K^+ en células de la raíz de *Triticum aestivum* cultivada en hidroponia y que de igual manera fue dependiente de la función fisiológica de la ATPasa P-tipo de la membrana plasmática (Wang *et al.* 2007). No obstante, poco se conoce acerca de los mecanismos que utilizan los metales para ingresar a las células de plantas acuáticas flotantes. Se ha estudiado el transporte de iones y la sensibilidad a metales de canales de la vacuola en raíces de *E. crassipes* (Paganetto *et al.*, 2001) y se ha sugerido que en *S. minima*, el Pb^{2+} es acumulado intracelularmente a través de canales de calcio (Olguín *et al.*, 2005).

Los resultados encontrados en ARS mostraron que la presencia de ácido propiónico y sulfato de magnesio afectó negativamente la $V_{\text{máx}}$ calculada ($p < 0.05$). Aunque el magnesio fue adicionado junto con el ácido propiónico y por lo tanto no es posible que de estos resultados se obtenga una evidencia clara de su efecto, probablemente la presencia de dicho metal (magnesio) haya afectado negativamente la acumulación de Pb^{2+} .

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la acumulación intracelular de Pb^{2+} por *S. minima* de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten.

Medio	$V_{m\acute{a}x}$ (mg/g h)	k_m (mg/L)	r^2
ARS	1.47 ± 0.11^a	8.750 ± 1.23^a	0.952
AD	2.01 ± 0.012^b	15.69 ± 0.67^b	0.893

ARS= agua residual sintética AD= agua desionizada

Los valores promedio con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Como se mencionó anteriormente el Pb^{2+} puede usar canales y transportadores de la membrana plasmática que normalmente funcionan en la acumulación de iones tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} debido a su similitud, i.e. el radio iónico, el estado de oxidación y la carga eléctrica del Pb^{2+} es muy similar a la del Ca^{2+} por lo cual pueden competir en su entrada a la células (Garland y Wilkins, 1981). Se ha descrito que la competencia entre Ca^{2+} y Pb^{2+} por entrar a la célula podría ser la causa de la baja concentración de Pb^{2+} encontrada en protoplastos de briofitas tales como *Funaria hygrometrica* (Krzyszowska et al., 2004). Asimismo, se ha reportado que existe competencia del magnesio en el transporte de Pb^{2+} a través de la membrana plasmática durante la acumulación de Pb^{2+} en raíces de *Oryza sativa* cultivada en hidroponía (Kim et al., 2002).

En resumen, cabe señalar que este helecho acuático, *S. minima*, satisface totalmente el criterio establecido para ser considerado como un hiperacumulador de Pb^{2+} . Los FBC calculados fueron mayores a 1000 en todos los tiempos de exposición y C_i (Zayed *et al.* 1998). Además, la cantidad del metal acumulado extra e intracelularmente fue 38 ($3.81 \pm 0.13\%$ bs) y 12.5 veces ($1.25 \pm 0.18\%$ bs), respectivamente y es mucho mayor que el valor mínimo establecido para hiperacumuladores de Pb^{2+} (0.1% bs) (Baker y Brooks 1989).

7 CONCLUSIONES

- La eliminación de Pb^{2+} de la columna de agua, en un sistema con *S. minima*, se puede predecir a través de un modelo de segundo orden.
- *S. minima* hiperacumuló Pb^{2+} en un amplio intervalo de concentraciones iniciales del metal y de tiempos de exposición.
- La alta adsorción de Pb^{2+} en *S. minima* se puede relacionar con sus características químicas, fisicoquímicas y a la gran superficie específica.
- Los factores de adsorción (FAD) y de acumulación intracelular (FAI) coadyuvieron a evaluar la hiperacumulación de Pb^{2+} en *S. minima*, la cual es principalmente debida a la adsorción.
- De acuerdo al modelo de cinética de adsorción de pseudo-segundo orden, se infirió que la quimioadsorción es el mecanismo de adsorción de Pb^{2+} predominante en *S. minima*.

- El equilibrio de adsorción de Pb^{2+} en *S. minima* se puede predecir usando los modelos de Langmuir y de Freundlich.
- La acumulación intracelular también contribuyó a la hiperacumulación de Pb^{2+} en *S. minima* y parece estar descrita por el modelo de Michaelis-Menten.

RECOMENDACIONES

- ✓ Conocer cuál es el papel de las fracciones químicas (proteínas, carbohidratos, lípidos), que componen la superficie de *S. minima*, en la adsorción de Pb^{2+} .
- ✓ Investigar si la producción de tioles (glutación y fitoquelatinas) es la responsable de la gran acumulación intracelular de Pb^{2+} en *S. minima*.
- ✓ Conocer cuál es el papel del ácido propiónico y del sulfato de magnesio, por separado, en el transporte del Pb^{2+} a través de la membrana plasmática.
- ✓ Investigar la eliminación de metales en un sistema multimetal con *S. minima* y específicamente en un agua residual real.
- ✓ Investigar los retos para la aplicación de sistemas con *S. minima* para la eliminación de metales a gran escala, en términos de factibilidad técnica y económica (reproducción de la biomasa, manejo de las lagunas, tratamiento de la biomasa contaminada, etc.).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, M., Nadeem, R., Nadeem-Zafar, M. y Arshad M. 2008. Biosorption of chromium (III) and chromium (VI) by untreated and pretreated *Cassia fistula* biomass from aqueous solutions. *Water Air & Soil Pollut* 191:139–148.
- Abedin, M. J., Feldmann, J., y Meharg, A. 2002. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiol* 128: 1120–1128.
- Ahlgren, G. y Merino, L. 1991. Lipid analysis of freshwater microalgae: a method study. *Arch Hydrobiol* 121: 295–306.
- Aksu, A. 2001. Biosorption of reactive dyes by dried activated sludge: equilibrium and kinetic modeling. *Biochem Eng J* 7: 79–84.
- Al-Hamdani, S.H. y Blair, S.L. 2004. Influence of copper on selected physiological responses in *Salvinia minima* and its potential use in copper remediation. *Am Fern J* 94(1):47-56.
- Al-Hamdani, S.F. y Ballow-Sirna, C. 2008. Physiological responses of *Salvinia minima* to different phosphorus and nitrogen concentrations. *Am Fern J* 98(2):71–82.
- AOAC (1990). Official Methods of Analysis. Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- Antosiewicz, D. 2005. Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environ Pollut* 134:23–34.
- Arnetoli, M., Vooijs, R., ten Bookum, W., Galardi, F., Gonnelli, C., Gabbrielli, R., Schat, H. y Verkleij, J.A.C. 2008. Arsenate tolerance in *Silene paradoxa* does not rely on phytochelatin-dependent sequestration. *Environ Pollut* 152:585-591.
- Baker, A. J. M. y Brooks, R. R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81–126.
- Baker AJM y Whiting, S.N. 2002. In search of the Holy Grail- a further step in understanding metal accumulation? *New Phytol* 155:1-3.
- Benaroya, R.O., Tzin, V., Tel-Or, E., Zamski, E. 2004. Lead accumulation in the aquatic fern *Azolla filiculoides*. *Plant Physiol Bioch* 42: 639-645.
- Béraud, E., Cotelle, S., Leroy, P. y Férard, J.F. 2007. Genotoxic effects and induction of phytochelatin in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutat Res-Gen Tox En* 633(2):122-116.
- Burton, D.T., Turley, S.D., Fisher, D.J., Green, D.J. y Shedd, T.R. 2006. Bioaccumulation of Total Mercury and Monomethylmercury in the Earthworm *Eisenia Fetida*. *Water Air & Soil Pollut* 170(1-4):37-54.
- Cao, T., Ni, L.Y. y Xie, P. 2004. Acute biochemical responses of a submersed macrophyte, *Potamogeton crispus* L., to high ammonium in an aquarium experiment. *J Freshwater Ecol* 19(2):279-284.
- Clemens, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 2212:475-486.
- Chen, J. P. y Wu, S. 2004. Simultaneous adsorption of copper ions and humic acid onto an activated carbon. *J Colloid Interf Sc* 280, 334–342.
- Christie, W. W. 1993. Preparation of lipid extracts from tissues. In W. W. Christie (Ed.), *Advances in Lipid Methodology – Two Dundee*: Oily Press. pp. 195–213.
- Costa, M.L., Santos, M.C., Carrapiço, F. 1999. Biomass characterization of *Azolla filiculoides* grown in natural ecosystems and wastewater *Hydrobiologia* 415: 323–327.

- Creissen, G., Firmin, J., Fryer, M., Kular, B., Leylang, N., Reynolds, H., Pastori, G., Wellburn, A. y Mullineaux, P. 1999. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *Plant Cell* 11: 1277–1291
- de Almeida, A.F., Valle, R.R., Mielke, M. S. y Gomes, F.P. 2007. Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. *Braz. J. Plant Physiol* 19(2):83-98.
- Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research* 37, 4311–4330.
- Degryse, F., Smolders, E. y Merckx, R. 2006. Labile Cd complexes increase Cd availability to plants. *Environ Sci & Technol* 40: 830–836.
- Demirbas, A. 2008. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review. *Journal of Hazardous Material* 157: 220–229.
- De la Rosa, G., Martínez-Martínez, A., Pelayo, H., Peralta-Videa, J.R., Sanchez-Salcido, B., Gardea-Torresdey, J.L. 2005. Production of low-molecular weight thiols as a response to cadmium uptake by tumbleweed (*Salsola kali*) *Plant Physiol Biochem* 43: 491–498.
- Dogan, M., Saygideger, S.D. y Colak, U. 2009. Effect of Lead Toxicity on Aquatic Macrophyte *Elodea Canadensis* Michx. *Bull Environ Contam Toxicol* 83:249–254.
- Doshi, H., Ray, A., Kothari, I.L. 2008. Bioremediation potential of *Chlorella*: spectroscopic, kinetics, and SEM studies. *International Journal of Phytoremediation*, 10:264–277.
- Duman, F. y Obali, O. 2008. Seasonal variation of metal accumulation and translocation in yellow pond-lily (*Nuphar lutea*). *Chem Spec Bioavailab* 20(3):181-190.
- Eapen, S., Singh, S. y D'Souza, S.F. 2007. Phytoremediation of Metals and Radionuclides. In: *Environmental Bioremediation Technologies*. Singh, S.N. and Tripathi, R.D. (Eds). Springer Berlin Heidelberg, pp 189-209.
- Elmaci, A., Özençin, N. y Yonar, T. 2009. Removal of chromium(III), copper(II), lead(II) and zinc(II) using *Lemna minor* L. *Freseb Environ Bull* 18(5):538-542.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2000. A handbook of constructed wetlands. <http://www.epa.gov/OWOW/wetlands/pdf/hand.pdf>
- Erentürk, S. y Malkoç, E. 2007. Removal of lead(II) by adsorption onto *Viscum album* L.: Effect of temperature and equilibrium isotherm analyses. *Appl Surf Sci*, 253 (10): 4727-4733.
- Estrella-Gómez, N., Mendoza-Cózatl, D., Moreno-Sánchez, R., González-Mendoza, D. Zapata-Pérez, O., Martínez-Hernández, A., Santamaría, J.M. 2009. The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb²⁺ by increasing phytochelatin synthesis via changes in *SmPCS* expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquatic Toxicol* 91: 320–328.
- FAO. www.fao.org
- Fayiga, A.O., Ma, L.Q., Cao, X., Rathinasabapathi, B. 2004. Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environ Pollut* 132:289–296.
- Flores-Céspedes, F., González-Pradas, E., Fernández-Pérez, M., Villafranca-Sánchez, M., Socías-Viciano, M. y Ureña-Amate, M. D. 2002. Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil. *J Environ Qual* 31: 880–888.

- Folch, J., Lees, M. y Stanley, G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509.
- Freitas, O.M.M., Martins, R.J.E., Delerue-Matos, C.C., Boaventura, R.A.R. 2008. Removal of Cd(II), Zn(II) and Pb(II) from aqueous solutions by brown marine macro algae: Kinetic modeling. *J Hazard Mater* 153: 493–501.
- Furman, N. H. 1975. Standard Methods of Chemical Analysis. New York: Krieger Publishing Company.
- Gadd, G.M. 2009. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment *J Chem Technol Biot* 84(1): 13-28.
- Gardea-Torresdey, J.L., de la Rosa, G., Peralta-Videa, J.R. 2004. Use of phytofiltration technologies in the removal of heavy metals: A review. *Pure App Chem* 76(4):801-813.
- Gardner, J.L. y Al-Hamdani, S.H. 1997. Interactive Effects of Aluminium and Humic Substances on *Salvinia*. *J. Aquat. Plant. Manage.* 35:30-34.
- Garland, C.J. y Wilkins, D.A. 1981. Effect of calcium on the uptake and toxicity of lead in *Hordeum vulgare* L. and *Festuca ovina* L. *New Phytol.* 87:581-593.
- Gavrilescu, M. 2004. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Eng Life Sci* 4(3):219-232.
- Glass, D.J. 2000. Economic potential of phytoremediation. En: Phytoremediation of Toxic Metals Raskin I & Ensley BD (Eds) John Wiley & Sons, New York, USA. pp. 15–31.
- Greenway, M. 2007. The Role of Macrophytes in Nutrient Removal using Constructed Wetlands. In: Environmental Bioremediation Technologies. Singh, S.N., Tripathi, R.D. (Eds). Springer Verlag. pp. 331-351.
- Gupta, M. y Devi, S. 1992. Cadmium Sensitivity Inducing Structural Responses in *Salvinia molesta* Mitchell. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49:436-443.
- Hall, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. 2002. *J Exp Bot* 53 (366):1-11.
- Hernández, E. y Olguín, E. J. 2002. Biosorption of heavy metals influenced by the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) biomass. *Environ Technol* 23: 1369–1377.
- Ho, Y. S. y McKay, G. 1999. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochem* 34: 451–465.
- Hoffman, T., Kutter, C. y Santamaría, J.M. Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. *Eng. Life Sci* 4(1): 61-65.
- Holm-Hansen, O. y Riemann, B. 1978. Chlorophyll a determination: improvements in methodology. *Oikos* 30:438–447.
- Huang, L.Z., Zeng, G.M., Huang, D.L., Li, L.F., Huang, P.M. y Xia, C.B. 2009. Adsorption of lead(II) from aqueous solution onto *Hydrilla verticillata*. *Biodegradation* 20(5):651-660.
- Hurd, N.A. y Sternberg, S.P. K. 2008. Bioremoval of Aqueous Lead Using *Lemna minor*. *Internat J Phytoremediat* 10 (4):278-288.
- Jacono, C.C. 2003. *Salvinia*. <http://salvinia.er.usgs.gov/>
- Jain, S.K., Vasudevan, P., Jha, N.K., 1990. *Azolla pinnata* R.Br. and *Lemna minor* for removal of lead and zinc from polluted water. *Water Res* 24 (2):177–183.
- Jaleel, C.A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Ine's, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z y Hong-Bo, S. y Panneerselvam, R. 2009. Antioxidant defense

- responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiol Plant* 31:427–436.
- Jarvis, M.D. y Leung, D.W.M. 2002. Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environ Experimental Bot.* 48: 21–32
- Jayaweera, M.W., Kasturiarachchia, J.C., Kularatnea, R.K.A. and Wijeyekoon, S.L.J. 2008. Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands. *J Environ Manage* 87(3): 450-460.
- Jha, B., Basha, S., Jaiswar, S., Mishra, B. Thakur, M.C. 2009. Biosorption of Cd(II) and Pb(II) onto brown seaweed, *Lobophora variegata* (Lamouroux): kinetic and equilibrium studies. *Biodegradation* 20:1–13.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. y Sharma, S. 2008. Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant Soil Environ* 54 (6): 262-270.
- Kaewprasit, C., Hequet, E., Abidi, N. y Gourlot, J. P. 1998. Application of methylene blue adsorption to cotton fiber surface area measurement. *J Cotton Sci* 2: 164–173.
- Kägi, J.H.R. 1991. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.* 205: 613–626
- Kahle, J. y Zauke, G. P. 2003. Trace metals in Antarctic copepods from the Weddell Sea (Antarctica). *Chemosphere* 51:409–417.
- Keskinkan, O., Goksu, M.Z.L., Yuceer, A., Basibuyuk, M. y Forster, C.F. 2003. Heavy metal adsorption characteristics of a submerged aquatic plant (*Myriophyllum spicatum*). *Process Biochem* 39 (179–183).
- Keskinkan, O., Goksu, M., Basibuyuk, M. y Forster, C.F. 2004. Heavy metal adsorption properties of a submerged aquatic plant (*Ceratophyllum demersum*). *Bioresource Technol* 92(2):197-200.
- Keskinkan, O., Goksu, M.Z.L., Yuceer, A. y Basibuyuk, M. 2007. Comparison of the Adsorption Capabilities of *Myriophyllum spicatum* and *Ceratophyllum demersum* for Zinc, Copper and Lead. *Eng Life Sci* 7(2): 192–196.
- Kim, Y. Y., Yang, Y. Y. y Lee, Y. 2002. Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiol Plantarum* 116: 368–372.
- Kohler, S.J., Cubillas, P., Rodríguez-Blanco, J.D., Bauer, C., Prieto, M. 2007. Removal of Cadmium from Wastewaters by Aragonite Shells and the Influence of Other Divalent Cations. *Env Sci Technol* 41:112-118.
- Krzeslowska, M., Wozny, A. y Konieczna-Koperska, J. 2004. Calcium ameliorates effects of lead in rottonema of *Funaria hygrometrica* Hedw. *Biol Plantarum* 48 (4):569-574.
- Khosravi, M., Rakhshae, R., Ganji, M.T. 2005. Pre-treatment processes of *Azolla filiculoides* to remove Pb(II), Cd(II), Ni(II) and Zn(II) from aqueous solution in the batch and fixed-bed reactors. *J Hazard Mater* B127:228–237.
- Kurniawan, T.A., Chan, G.Y.S., Lo, W. y Babe, S. 2006. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chem Eng J* 118: 83–98.
- Lacher, C. y Smith, R.W. 2002. Sorption of Hg(II) by *Potamogeton natans* dead biomass. *Miner Eng* 15 (3):187-191.
- Landolt, E. 1986. The family of *Lemnaceae*—A monographic study. Vol. 1. Stiftung Rübél 71. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH Zürich.
- Lazaridis, N. K. y Asouhidou, D. D. 2003. Kinetics of sorption removal of chromium (VI) from aqueous solutions by calcined Mg–Al–CO₃ hydrotalcite. *Water Research*

- 37: 2875–2882.
- Lengs, R.Aa, Stambolie, J.H., Bell R. 1995. Duckweed – a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish. *Livestock Research for Rural Development* 7:1-11.
- Lesage, E., Mundia, C., Rousseau, D.P.L., Van de Moortela, A.M.K., 2007. Sorption of Co, Cu, Ni and Zn from industrial effluents by the submerged aquatic macrophyte *Myriophyllum spicatum* L. *Ecol Eng* 30:320–325.
- Liao, S.W. and Chang, N.L. 2004. Heavy metal phytoremediation by water hyacinth at constructed wetlands in Taiwan. *Journal of Aquatic Plant Management* 42:60-68.
- Lloyd-Jones, P.J., Rangel-Mendez, J.R., Streat, M. 2004. Mercury sorption from aqueous solution by chelating ion exchange resins, activated carbon and a biosorbent. *Process Safety and Environmental Protection* 82 (B4): 301-311.
- Maine, M.A., Suñe, N. y Lager, S.C. 2004. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. *Water Res* 38:1494–1501.
- Mallick, N. 2003. Biotechnological potential of *Chlorella vulgaris* for accumulation of Cu and Ni from single and binary metal solutions. *World J Microbiol & Biotechnol* 19: 695–701.
- Marchiol, L., Sacco, P., Assolari, S. y Zerbi, G. 2004. Reclamation of polluted soil: Phytoremediation potential of crop-related Brassica species. *Wat Air & Soil Pollut* 158(1):345-356.
- Marchiol, L., Fellet, G., Perosa, D. y Zerbi, G. 2007. Removal of trace metals by Sorghum bicolor and Helianthus annuus in a site polluted by industrial wastes: A field experience. *Plant Physiol & Biochem* 45:379-387.
- Marmioli, M., Antonioli, G., Maestri, E., Marmioli, N. 2005. Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis, *Environ. Poll.* 134:217–227.
- McMurry, J. 2003. *Fundamentals of Organic Chemistry* (5 ed.). Agnus McDonald. pp. 409.
- Meharg, A. A. y Macnair, M. R. 1992. Genetic correlation between arsenate tolerance and the rate of arsenate and phosphate uptake in *Holcus lanatus* L. *Heredity* 69:336–341.
- Meharg, A.A. 2005. Mechanisms of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications. *Plant soil* 274:163–174.
- Meyer, A.J. y Fricker, M.D. 2002. Control of demand-driven biosynthesis of glutathione in green *Arabidopsis* suspension culture cells. *Plant Physiol* 130:1927-37.
- Miretzky, P., Saralegui, A. y Fernández-Cirelli, P. 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina), *Chemosphere* 57 (8):997–1005.
- Miretzky, P., Saralegui, A. y Fernández-Cirelli, P. 2006. Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes. *Chemosphere* 62: 247–254.
- Mishra, S., Srivastava, S. Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K. 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65(6):1027-1039.
- Mohanty, K., Jha, M., Meikap, B.C. y Biswas, M.N. 2006. Biosorption of Cr(VI) from aqueous solutions by *Eichhornia crassipes*. *Chem Eng J* 117(1):71-77.

- Moreno-Sánchez, R., Díaz-Barriga, F. y Devars, S. 1999. Mecanismos de toxicidad y de tolerancia a los metales pesados. En: Contaminación Ambiental por Metales Pesados. Cervantes, C. y Moreno-Sánchez, R. (Ed.s) AGT Editor, S.A. México, D.F. Pp: 11-40.
- Mukherjee, S. y Kumar, S. Adsorptive uptake of arsenic (V) from water by aquatic fern *Salvinia natans*. 2005. *J Water Supply Res T* 54(1): 47-53.
- Nichols, B.M. 1963. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: improvements in analysis by thin-layer chromatography. *Biochim Biophys Acta* 70:417-422.
- Nichols, P.B., Couch, J.D. y Al-Hamdani, S.H. 2000. Selected Physiological Responses of *Salvinia minima* to different Chromium Concentrations. *Aquatic Botany* 68:313-319.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. y Foyer, C.H. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 53:1283-1304.
- Olguín, E.J. Hernández, E., Coutiño, P. and González, R. 1994. Aprovechamiento de Plantas acuáticas para el tratamiento de aguas Residuales. En: *Tecnologías Ambientales para el Desarrollo Sustentable* [Olguín, Peña, Hernández, Camacho, Comp.] Instituto de Ecología, A.C.
- Olguín, E. J., Hernández, E. y Ramos, I. 2002. The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. *Acta Biotechnol* 22:121–13.
- Olguín, E.J., Sánchez-Galván, G., Pérez-Pérez, T. y Pérez-Orozco, A. 2005. Surface adsorption, intracelular accumulation and compartmentalization of lead in batch operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients, *J Ind Microbiol & Biotechnol* 32:577–586.
- Olguín, E.J., Vidal-Álvarez, M., Sánchez-Galván, G. 2008. Remoción de Pb con microalgas rizosféricas (*Lyngbya* sp.) de *Salvinia minima*. II Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal. Xalapa, México. Octubre 5-10.
- Olguín, E.J. y Sánchez-Galván, G. 2010. Aquatic phytoremediation: novel insights in tropical and subtropical regions. *Pure Appl Chem* 82(1):27-38.
- Oliveira, W.E., Franca, A.S., Oliveira, L.S. and Rocha, S.D. 2008. Untreated coffee husks as biosorbents for the removal of heavy metals from aqueous solutions. *J Hazard Mater* 152:1073–1081.
- Outridge, P.M., Rauser, W.E. y Hutchinson, T.C. 1991. Changes in metal-binding peptides due to acclimation to cadmium transferred between ramets of *Salvinia minima* *Oecologia* 88:109-115.
- Padmavathiamma, P.K. y Li, L.Y. 2007. Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water Air, Soil & Pollut* 184:105–126.
- Paganetto, A., Carpaneto, A., & Gambale, F. 2001. Ion transport and metal sensitivity of vacuolar channels from the roots of the aquatic plant *Eichhornia crassipes*. *Plant Cell & Environ* 24:1329–1336.
- Patsoukis, N. y Georgiou, C.D. 2004. Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators. *Anal Bioanal Chem* 378: 1783–1792.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B. y Sharma, A. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 52:199-223.

- Peer, W. A., Baxter, I. R., Richards, E. L., Freeman, J. L. y Murphy, A. S. 2006. Phytoremediation and hyperaccumulator plants. *Top Curr Genetics* 14: 299–340.
- Peng, K., Luo, C., Lou, L., Li, X. y Shen, Z. 2008. Bioaccumulation of heavy metals by the aquatic plants *Potamogeton pectinatus* L. and *Potamogeton malaianus* Miq. and their potential use for contamination indicators and in wastewater treatment. *Sci Total Environ* 392: 22-29.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 56:15–39.
- Pilon-Smits, E. y Freeman, J.L. 2006. Environmental cleanup using plants: Biotechnological advances and ecological considerations. *Front Ecol Environ* 4 (4): 203–210.
- Polec-Pawlak, K., Ruzik, R., Lipec, E., Ciuzyńska, M. y Gawronska, H. 2007. Investigation of Pb(II) binding to pectin in *Arabidopsis thaliana*. *J Anal Atom Spectrom* 22:968–972.
- Prado, A. G. S., Souza, S. M., Lopes da Silva, W. T. y Rezende, M. O. 1999. Development of a filtration and titration method for the determination of the acidity of humic acids. *Quim Nova* 22: 894–89.
- Prasad, M.N.V. 2003. Phytoremediation of Metal-Polluted Ecosystems: Hype for Commercialization. *Russ J Plant Physiol* 50(5): 686–700.
- Rai, P.K. 2008. Heavy metal pollution in aquatic ecosystems and its phytoremediation using wetland plants: An ecosustainable approach, *Int J Phytoremediat* 10:133–160.
- Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J.J., Ga'rate, A., 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. *Plant. Sci.* 162, 761–767.
- Rakhshaei, R., Khosravi, M. y Ganji, M.T. 2006. Kinetic modeling and thermodynamic study to remove Pb(II), Cd(II), Ni(II) and Zn(II) from aqueous solution using dead and living *Azolla filiculoides*. *J Hazard Mater B* 134:120–129.
- Rakhshaei, R., Giah, M. y Pourahmad, A. 2009. Studying effect of cell wall's carboxyl- carboxylate ratio change of *Lemna minor* to remove heavy metals from aqueous solution. *J Hazard Mater* 163(1):165-173.
- Rao, A.S.V.C. y Reddy, A.R. 2008. Glutathione Reductase: A Putative Redox Regulatory System in Plant Cells. En: *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*. Khan, N.A., Umar, S. y Singh, S. (ed.s). Springer Berlin Heidelberg, pp.111-147.
- Rausser W. E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants : the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell. Biochem Biophys* 31 :1-29.
- Regvar, M. y Vogel-Mikuš, K. 2008. Recent Advances in Understanding of Plant Responses to Excess Metals: Exposure, Accumulation, and Tolerance. En: *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*. Khan, N.A., Umar, S. y Singh, S. (ed.s). Springer Berlin Heidelberg, pp.227-251.
- Rozentsvet, O.A., Rezanka, T., Bosenko, E.S., Uzhametskaya, E.A., Dembitskii, V.M. 2005. Fatty acids, phospholipids, and the betaine lipid DGTS from the aquatic fern *Salvinia natans*. *Chemistry of Natural Compounds* 41(5):487-490.
- Sahi, S.V., Bryant, N.L., Sharma, N.C. y Singh, S.R. 2002. Characterization of a lead hyperaccumulator shrub, *Sesbania drummondii*. *Environ Sci & Technol* 36 (21):4676-4680.

- Samardakiewicz, S. y Wozny, A. 2000. The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip. *Plant Soil* 226:107–111.
- Sánchez-Galván, G., González-Portela, E., Olguín, E.J. 2006. Lead biosorption by non-living *Salvinia minima* biomass in batch systems. VIII International Symposium on Environmental Biotechnology. Leipzig, Germany. July 9-13.
- Sánchez-Galván, G. y Olguín, E.J. 2009. A Holistic Approach to Phytofiltration of Heavy Metals: Recent Advances in Rhizofiltration, Constructed Wetlands, Lagoons, and Bioadsorbent-Based Systems. En: *Handbook of Advanced Industrial and Hazardous Wastes Treatment* (Ed: Wang, L.K., Hung, Y.T. & Shamas, N. K.). CRC Press Taylor & Francis Group. Pp. 389-408.
- Sanità di Toppi, L., Vurro, E., Rossi, L., Marabottini, R., Musetti, R., Careri, M., Maffini, M., Mucchino, C., Corradini, C. y Badiani, M. 2007. Different compensatory mechanisms in two metal-accumulating aquatic macrophytes exposed to acute cadmium stress in outdoor artificial lakes. *Chemosphere* 68(4):769-780.
- Saygideger, S., Gulnaz, O., Istifli, E.S. y Yucel, N. 2005. Adsorption of Cd(II), Cu(II) and Ni(II) ions by *Lemna minor* L.: Effect of physicochemical environment *J Hazard Mater B126*: 96–104.
- Schnitzer, M. y Gupta, U.C. 1965. Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 29:274–277.
- Schnitzer, M. 1982. Organic matter characterization.. In *Methods of soil analysis*. Part 2. A.L. Page et al. (ed.) 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI. Pp. 581–594
- Schneider, I. A. H. y Rubio, J. 1999. Sorption of heavy metal ions by the nonliving biomass of freshwater macrophytes. *Environ Sci & Technol* 33: 2213–2217.
- Schneider, I.A.H., Smith, R.W. y Rubio, J. 1999. Effect of mining chemicals on biosorption of Cu(II) by the non-living biomass of the macrophyte *Potamogeton lucens*. *Miner Eng* 12 (3):255-260.
- Schneider, I.A.H., Rubio, J. y Smith, R.W. 2001. Biosorption of metals onto plant biomass: exchange adsorption or surface precipitation? *Int. J. Miner. Process.* 62 2001.111–120.
- Sen, A.K. and Mondal, N.G. 1987. *Salvinia natans* – As the scavenger of Hg (II). *Water Air & Soil Pollut* 34: 439-446.
- Sen, A.K. and Mondal, N.G. 1990. Removal and uptake of copper (II) by *Salvinia natans* from wastewater. *Water, Air & Soil Pollut* 49:1-6.
- Seregin, I.V. y Ivanov, V.B. 2001. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russ J Plant Physiol* 48 (4):523–544.
- Seregin, I.V. y Kozhevnikova, A.D. 2009. Enhancement of nickel and lead accumulation and their toxic growth-inhibitory effects on amaranth seedlings in the presence of calcium. *Russ J Plant Physiol* 56(1):80-84.
- Sharma, P. y Dubey, S. 2005. Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17(1):35-52.
- Sharma, S.S. y Dietz, K.J. 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot* 57(4):711–726.
- Slaveykova, V. y Wilkinson, K. J. 2002. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ Sci & Technol* 36: 969–975.
- Sousa, A.I., Cacador, I., Lillebø, A.I., Pardal, M.A. 2008. Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*: Intra- and extra-cellular metal binding sites *Chemosphere* 70 (2008) 850–857.

- Sriprang, R. y Murooka, Y. 2007. Accumulation and Detoxification of Metals by Plants and Microbes. In: Environmental Bioremediation Technologies Shree N. Singh and Rudra D. Tripathi (eds). Springer Berlin Heidelberg. pp.77-100.
- Stirk, W.A. y van Staden, J. 2001. some physical factors affecting adsorption of heavy metals from solution by dried brown seaweed material. *S Afr J Bot* 67:615-619.
- Sundberg-Jones, S. E. y Hassan, S. M. 2007. Macrophyte sorption and bioconcentration of elements in a pilot constructed wetland for flue gas desulfurization wastewater treatment. *Water Air & Soil Pollut* 183:187–200.
- Sunkar, R., Kaplan, B., Bouché, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I. N., Maathuis, F.J.M., Sanders, D., Bouchez, D. y Fromm, H. 2000. Expression of a truncated tobacco tCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* CNGGC1 gene confer Pb²⁺ tolerance. *Plant J* 24:533–542.
- Suñe, N., Sánchez, G., Caffaratti, S. y Maine, M.A. 2007. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environ Pollut* 145: 467-473.
- Szalai, G., Kellos, T., Galiba, G. y Kocsy, G. 2009. Glutathione as an Antioxidant and Regulatory Molecule in Plants Under Abiotic Stress Conditions. *J Plant Growth Regul* 28:66-80.
- Tamura, H., Honda, M., Sato, T. y Kamachi, H. 2005. Pb hyperaccumulation and tolerance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *J Plant Res* 118, 355–359.
- Tiemann, K. J., Gamez, G., Dokken, K., Parsons, J. G. y Gardea-Torresdey, J. L. 2002. Chemical modification and X-ray absorption studies for lead (II) binding by *Medicago sativa* biomass. *Microchem J* 71: 287–293
- Tien, C. J. 2002. Biosorption characteristics of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. *Process Biochem* 38: 605–613.
- Tong, Y.P., Kneer, R. y Zhu, Y.G. 2004. Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends Plant Sci* 9 (1): 7-9.
- Uysal, Y. y Taner, F. 2009. Effect of pH, temperature, and lead concentration on the bioremoval of lead from water using *Lemna minor*. *Int J Phytorem* 11 (7): 591-608.
- Verma, P., George, K.V., Singh, H.V., Singh, S.K., A., Juwarkar, A. y Singh, R.N. 2006. Modeling rhizofiltration: Heavy-metal uptake by plant roots. *Environ Model Assess* 11:387–394.
- Verma, V.K., Tewari, S. y Rai, J.P.N. 2008. Ion exchange during heavy metal biosorption from aqueous solution by dried biomass of macrophytes. *Bioresource Technol* 99(6):1932-1938.
- Vermaat, J. E. y Hanif, M. K. 1998. Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and the waterfern *Azolla filiculoides* on different types of waste water. *Water Res* 32:2569–2576.
- Volesky, B. 2003. Sorption and Biosorption. Montreal: BV Sorbex Inc.
- Vymazal, J. 2007. Removal of nutrients in various types of constructed wetlands, *Sci Total Environ* 380:48–65.
- Vymazal, J. y Kropfelová, L., *Wastewater Treatment in CW with horizontal Sub-surface Flow*. Springer-Verlag, 2008.

- Wang, T. C., Weissman, J. C., Ramesh, G., Varadarajan, R. y Benemann, J. R. 1996. Parameters for removal of toxic heavy metals by water milfoil (*Myriophyllum spicatum*). *B Environ Contam & Tox* 57: 779–786.
- Wang, Q., Cui, Y. y Dong, Y. 2002. Phytoremediation of polluted waters potentials and prospects of wetland plants. *Acta Biotechnol* 22(1-2):199-208.
- Wang, H., Shan, W., Lui, T., Xie, Y., Wen, B., Zhang, S., Han, F. y van Genuchten, M.T. 2007. Organic acids enhance the uptake of lead by wheat roots. *Planta* 225:1483–1494.
- Wu, J.S., Ho, T.C., Chien, H.C., Wu, Y.J., Lin, S.M. y Juang, R.H. 2008. Characterization of the high molecular weight Cd-binding complex in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) when exposed to Cd. *J Agr & Food Chem* 56 (14):5806-5812.
- Yang, C.Z., Wang, S.R., Zeng, A.Y., Jin, X.C., Xu, Q.J. y Zhao, J.Z. 2005. Equilibrium and kinetics of copper(II) biosorption by *Myriophyllum spicatum* L. *J Environ Sci-China* 17(6):1025-1029.
- Ye, Z.H., Cheung, K.C. y Wong, M.H. 2003. Cadmium and nickel adsorption and uptake in cattail as affected by iron and manganese plaque on the root surface. *Commun Soil Sci Plan* 34(19-20):2763-2778.
- Zayed, A., Suvanalatha, G. y Terry, N. 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetlands plants: I. Duckweed. *J Environ Qual* 27:715–721.
- Zornoza, P., Vázquez, S., Esteban, E., Fernández-Pascual, M., Carpena, R. 2002. Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol Biochem*. 40:1003–1009.

Assessment of the Hyperaccumulating Lead Capacity of *Salvinia minima* Using Bioadsorption and Intracellular Accumulation Factors

Gloria Sánchez-Galván · Oscar Monroy ·
Jorge Gómez · Eugenia J. Olguín

Received: 13 December 2007 / Accepted: 24 March 2008 / Published online: 9 May 2008
© Springer Science + Business Media B.V. 2008

Abstract *Salvinia minima* has been reported as a cadmium and lead hyperaccumulator being the adsorption and intracellular accumulation the main uptake mechanisms. However, its physicochemical properties, the effect of metal concentration and the presence of organic and inorganic compounds on its hyperaccumulating capacity are still unknown. Furthermore, the specific adsorption and accumulation mechanisms occurring in the plant are not clear yet. Thus, based on a compartmentalization analysis, a

bioadsorption (BAF) and an intracellular accumulation factor (IAF) were calculated in order to differentiate and quantify these two mechanisms. The use of kinetic models allowed predicting the specific type of uptake mechanisms involved. Healthy plants were exposed to five lead concentrations ranging from 0.80 ± 0.0 to 28.40 ± 0.22 mg Pb²⁺l⁻¹ in batch systems. A synthetic wastewater, amended with propionic acid and magnesium sulfate, and deionized water were used as media. The BAF and IAF contributed to gain an in-depth insight into the hyperaccumulating lead capacity of *S. minima*. It is clear that such capacity is mainly due to adsorption (BAF 780–1980) most likely due to its exceptional physico-chemical characteristics such as a very high surface area (264 m² g⁻¹) and a high content of carboxylic groups (0.95 mmol H⁺ g⁻¹ dw). Chemisorption was predicted as the responsible mechanism according to the pseudo-second order adsorption model. Surprisingly, the ability of *S. minima* to accumulate the metal into the cells (IAF 57–1007) was not inhibited at concentrations as high as 28.40 ± 0.22 mg Pb²⁺l⁻¹.

G. Sánchez-Galván · E. J. Olguín (✉)
Unidad de Biotecnología Ambiental,
Instituto de Ecología, A.C.,
km 2.5 Carretera Antigua a Coatepec
351 Congregación El Haya,
Xalapa Ver. 91070, México
e-mail: eugenia.olguin@inecol.edu.mx

G. Sánchez-Galván
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas,
Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa, México, D.F.

O. Monroy · J. Gómez
Departamento de Biotecnología,
DCBS Grupo de Ciencia y Tecnología Ambiental
(CyTAM), Universidad Autónoma Metropolitana,
Av. San Rafael Atlixco 186, Col, Vicentina,
C.P. 09340 Iztapalapa, México, D.F.

Keywords Phytoremediation · Heavy metals ·
Aquatic fern · Propionic acid · Magnesium sulfate

Abbreviations

dw Dry weight
TKN Total Kjeldahl Nitrogen

SWW	Synthetic Wastewater
DW	Deionized Water
IC	Initial Lead Concentration
BCF	Bioconcentration Factor
BAF	Bioadsorption Factor
IAF	Intracellular Accumulation Factor
FOK _s	Pseudo-first order rate equation
SOK _s	Pseudo-second order rate equation
q_t	Sorption capacity (mg g^{-1}) at time t (h)
q_e	Sorption capacity (mg g^{-1}) at equilibrium
k_1	Rate constant of pseudo-first order sorption (l h^{-1})
k_2	Rate constant of pseudo-second order sorption ($\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$)
t	Contact time (h)
h	Initial sorption rate ($\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
q	Metal uptake capacity (mg g^{-1})
q_{max}	Maximum adsorption capacity (mg g^{-1})
b	Langmuir constant related to energy of adsorption (l mg^{-1})
C_e	Concentration of the metal in liquid phase at equilibrium (mg l^{-1}).
K	Freundlich constant related to sorption capacity [$(\text{mg g}^{-1})(\text{l mg}^{-1})^{1/n}$]
n	Freundlich constant related to sorption intensity
V	Intracellular accumulation rate at time t ($\text{mg Pb}^{2+} \text{g biomass h}^{-1}$)
V_{max}	Maximal intracellular accumulation rate ($\text{mg Pb}^{2+} \text{g biomass h}^{-1}$)
K_m	Lead concentration at which a half of the maximal intracellular accumulation rate is attained (mg)

1 Introduction

Lead is present in the wastewaters from petrochemical, painting and coating, newsprint, smelting, metal electroplating, mining, plumbing and battery industries, etc. Unfortunately, in some cases lead is discharged into the environment without adequate treatment. It may be transported into water bodies by natural circulation and become a threat to human life due to its well-known toxicity, accumulation in food chains and persistence in nature (Zhan and Zhao 2003).

Phytoremediation is a promising, cost-effective, and environmentally friendly technology for the treatment of contaminated soils or wastewaters

(Padmavathamma and Li 2007). Its success greatly depends on the surface physicochemical characteristics of the utilized plant and its biological properties such as productivity, geographical distribution and tolerance to toxic compounds.

Salvinia minima Baker, is a small free-floating aquatic fern native to Mexico, Central and South America (Madeira et al. 2003). It has many advantages for use in phytoremediation, including its higher capacity for treating high-strength organic wastewater compared to that of *Spirodela polyrrhiza* (Olguín et al. 2007) and its efficiency for nutrient removal from coffee processing plant wastewaters (Olguín et al. 2003). *S. minima* has also been reported as a hyperaccumulator of Cd^{2+} (Olguín et al. 2002) and Pb^{2+} (Olguín et al. 2005). Surface adsorption and intracellular accumulation were found to be the main mechanisms for lead removal using a free EDTA and phosphate medium in batch systems. The relevance of using a compartmentalization analysis complementary to the use of Bioconcentration Factors (BCF) and metal removal kinetics, to gain full insight into the process of heavy metal removal by plants, has also been demonstrated (Olguín et al. 2005).

Hyperaccumulators absorb unusually large amounts of metals compared to other plants. The defined levels for hyperaccumulators proposed by Baker and Brooks (1989) are typically at a concentration of one order of magnitude greater than those found in non-accumulator species (Peer et al. 2006). On the other hand, Zayed et al. (1998) also proposed the use of two arbitrary criteria for classifying plants as hyperaccumulators: a) its ability to take up more than 0.5% dry weight (dw) of a given element, and b) its ability to bioconcentrate the element in its tissues, e.g., a $\text{BCF} > 1000$. However, such parameters do not differentiate between the ability of the plant to adsorb the metal onto its surface and its ability to accumulate it intracellularly. Thus, the establishment of more appropriate factors that allows a separate quantification of each one of the two removal mechanisms is highly desirable.

Kinetic and equilibrium models have been extensively utilized to evaluate metal adsorption capacity in dead biomass (Ho and McKay 1999; Volesky 2003) but only a limited number of studies have focused on the kinetic analysis of adsorption and intracellular accumulation of metal ions using living biomass (Noraho and Gaur 1996; Mallick 2003). Such kinetic

models allow predicting the occurrence of the specific uptake mechanisms in the biomass.

Taking into consideration that no reports are available regarding the physicochemical properties of *S. minima* even though it has been shown to be highly efficient in lead and cadmium uptake, one of the objectives of this research was to characterize its surface. A second objective was to evaluate the effect of metal concentration and the presence of organic (propionic acid) and inorganic compounds (magnesium sulfate) on its hyperaccumulating capacity. Based on the use of a compartmentalization analysis, this work aimed at to differentiate and quantify separately the uptake mechanisms. In addition, by using kinetic models, a prediction of specific uptake mechanisms was pursued.

2 Materials and Methods

2.1 Inoculum Preparation and Rhizospheric Microalgae Quantification

S. minima, from the germplasm collection of the Environmental Biotechnology Unit at the Institute of Ecology, was cultivated and maintained as a mono-plant culture in a temperature controlled chamber at 25°C, utilizing 1/10 modified Hutner medium (Vermat and Hanif 1998) at pH 6.0. Light intensity was 135 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and it was provided by day white lamps (Philips, 39 W) operating in cycles of 16 h light and 8 h darkness. Biomass was washed for 5 minutes in running tap water in order to decrease the presence of rhizospheric microalgae before being used. To quantify the amount of microalgae remaining attached to *S. minima*, 26.37 g of washed biomass was shaken during 1 h in 600 ml of distilled water in order to remove the microalgae from the surface biomass and to determine the chlorophyll content. The medium and biomass were transferred to a plastic vessel containing 900 ml of distilled water and they were homogenized with a magnetic stirrer for 5 min. Biomass was removed and aliquots of 2 ml were taken and filtered on Whatman filter paper (20–25 μm) for chlorophyll extraction using concentrated methanol (5 ml). After 24 h, samples were centrifuged at 872 \times g for 10 min and the absorption of the supernatant was determined at 665 and 750 nm. Chlorophyll content was

calculated using the following formula (Holm-Hansen and Riemann 1978):

$$\text{Chl-a } (\mu\text{g l}^{-1}) = \frac{[Abs_{665\text{nm}} - Abs_{750\text{nm}}] A V_m}{V_s L}$$

A absorbance coefficient of chlorophyll-a in methanol (12.63)

V_m volume of methanol used for extinction (ml)

V_s liters of water filtered

L path length of cuvette

2.2 Physico-chemical Characterization of Biomass

Analysis of dry matter and ashes were performed according to AOAC (1990). Total carbohydrates were determined according to Hernández and Olguín (2002). The protein content was quantified through the total Kjeldahl nitrogen (TKN) (micro Kjeldahl method, Furman 1975) using the following formula: % Protein=TKN \times 6.25 (AOAC 1990). Lipids were extracted, purified and quantified according to Christie (1993) and Ahlgren and Merino (1991). The apparent density was determined in a standard pycnometer while the water retention was evaluated by the difference between wet and dry weight (dw) of the material, after being wetted by soaking and removing the water excess by filtration. The surface area was determined by the methylene blue adsorption method (Kaewprasit et al. 1998). Total acidity was measured by the method of barium hydroxide and the carboxylic groups were quantified by using calcium acetate (Prado et al. 1999). The total amount of phenolic hydroxyl groups was determined according to Flores-Céspedes et al. (2002): Phenolic hydroxyl acidity=(total surface acidity) – (carboxylic acidity).

2.3 Kinetic Experiments

42.85 g dw washed biomass m^{-2} were inoculated into hard plastic containers of 0.145 m \times 0.175 m containing 1.5 l of medium. The column water had a depth of 0.06 m and the container had a total surface area of 0.02537 m^2 . Pb^{2+} removal was evaluated in two different media a) a synthetic wastewater (SWW) prepared with deionized water amended with propionic acid (98 mg l^{-1}) and magnesium sulfate (107 mg l^{-1}) and b) deionized water (DW). Five different initial Pb^{2+} concentrations (IC) were utilized: 0.80 \pm 0.0, 2.70 \pm 0.03, 4.70 \pm 0.06, 15.18 \pm 0.55 and

28.40±0.22 mg Pb²⁺ l⁻¹. Three experimental units were used as replicates for each exposure time (0.5, 2, 4, 6, 8 and 24 h). Additionally, two kinds of controls were established for each treatment. The first one, which contained lead at the same IC of the treatment without biomass, was used to determine the possible adsorption of lead onto the surface of the containers. The second one, containing biomass without addition of lead to the medium, was utilized to confirm the absence of lead in the plant and medium. The content of lead in the water column in the first type of control did not change along the experimental time, indicating that no lead adsorption occurred in the system. No lead was quantified in either plant or medium in the second type of control. Water samples and the total of biomass were removed and treated for compartmentalization analysis after each exposure time. In all cases, pH was adjusted to 6.0. The experiments were carried out in a temperature-controlled chamber at 25±2°C and the experimental units were exposed at a light intensity of 116 μmolm⁻² s⁻¹ provided by day white lamps (Philips, 39 W) operating in cycles of 16 h light/8 darkness.

2.4 Compartmentalization Analysis

To assess the distribution of lead among various compartments of the experimental microcosms (the plant tissue, the water column and the sediments), a compartmentalization analysis was carried out as described by Olguín et al. (2005). Biomass was collected and washed with deionized water to remove residues from the medium at the end of each exposure time in the kinetic experiments. Plant biomass was then washed with an EDTA solution (molar ratio EDTA/Pb=12) and after that, it was rinsed with deionized water. Pb²⁺ adsorbed to the biomass surface was then quantified in both solutions. The EDTA-washed biomass was dried at 50°C and then digested with concentrated HNO₃ to quantify Pb²⁺ accumulated into the plant tissue. Samples from the water column were collected and filtered through Whatman paper (pore size=11 μm) to remove insoluble particles. Liquid samples and digested biomass were analyzed in an Atomic Absorption Spectrophotometer Buck Scientific 210-Variable Giant Pulse (VGP) using an air-acetylene flame.

2.5 Bioadsorption and Intracellular Accumulation Factors

Two different factors were determined as follows, using the data resulting from the compartmentalization analysis:

Bioadsorption Factor (BAF):

$$\text{BAF} = \frac{\text{lead adsorbed onto biomass (mg kg}^{-1}\text{ biomass d.w.)}}{\text{concentration of lead in the solution (mg l}^{-1}\text{)}}$$

Intracellular Accumulation Factor (IAF):

$$\text{IAF} = \frac{\text{lead accumulated intracellularly (mg kg}^{-1}\text{ biomass d.w.)}}{\text{concentration of lead in the solution (mg l}^{-1}\text{)}}$$

2.6 Lead Adsorption Kinetics

Pseudo-first order (FOK_s) and pseudo-second order (SOK_s) rate equations were used for evaluating the kinetics of Pb²⁺ adsorption. Pseudo-first rate equation (Largreen model) is expressed as follows (Lazaridis and Asouhidou 2003):

$$\frac{dq}{dt} = k_1(q_e - q_t)$$

which is solved as:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t$$

where q_t and q_e are the sorption capacity (mg g⁻¹) at time t (h) and at equilibrium respectively. k_1 is the rate constant of pseudo-first order sorption (l h⁻¹).

The pseudo-second order rate equation (Ho and McKay 1999) is expressed as:

$$\frac{dq}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2$$

which can be solved as:

$$\frac{t}{q_e} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}$$

$$\text{and } k_2 q_e^2 = h$$

where t is the contact time (h), q_t and q_e are the sorption capacity (mg g⁻¹) at time t and at equilibrium respectively. k_2 is the rate constant of pseudo-second order sorption (g mg⁻¹ h⁻¹) and h is the initial sorption rate (mg g⁻¹ h⁻¹).

2.7 Lead Adsorption Equilibrium

Two adsorption models were chosen for comparison with experimental data (Volesky 2003).

The Langmuir model:

$$q = \frac{q_{\max} b C_e}{1 + b C_e}$$

where q is the metal uptake capacity, q_{\max} is the maximum adsorption capacity (mg g^{-1}), b is a Langmuir constant related to energy of adsorption (l mg^{-1}) and C_e is the concentration of the metal in liquid phase at equilibrium (mg l^{-1}).

The Freundlich model:

$$q = K C_e^{1/n}$$

where K [$(\text{mg g}^{-1})(\text{l mg}^{-1})^{1/n}$] and n are Freundlich constants related to adsorption capacity and intensity, respectively. C_e is the concentration of the metal in liquid phase at equilibrium (mg l^{-1}).

2.8 Intracellular Lead Accumulation Kinetics

The Michaelis–Menten model (Abedin et al. 2002) was employed to describe the intracellular accumulation of Pb^{2+} ions into *S. minima* cells in the range of the initial metal concentration (IC) tested.

$$V = \frac{V_{\max} [\text{Pb}]}{K_m + [\text{Pb}]}$$

where:

V intracellular accumulation rate at time t ($\text{mg Pb}^{2+} \text{g biomass h}^{-1}$)

V_{\max} maximal intracellular accumulation rate ($\text{mg Pb}^{2+} \text{g biomass h}^{-1}$)

K_m lead concentration at which a half of the maximal intracellular accumulation rate is attained (mg).

$[\text{Pb}]$ lead concentration in the solution (mg l^{-1})

Data obtained at 4 h were chosen to investigate such concentration-dependent kinetics since at this relatively short period, a constant uptake rate was observed.

2.9 Statistical Analysis

Linear regression, non-linear regression and variance analyses were carried out using the REG and ANOVA procedures of SPSS statistical package (version 3.0.1, SPSS Inc., Chicago, IL).

3 Results

3.1 Rhizospheric Microalgae Quantification and Physico-chemical Characterization of *Salvinia minima* Biomass

The biomass of *S. minima* was washed for 5 minutes with tap water to reduce the presence of microalgae on its surface before being used in the kinetics experiments. After washing, the amount of microalgae remaining onto the washed biomass decreased significantly by 92.45% (21.87 ± 8.46 vs. $1.65 \pm 0.91 \mu\text{g chl-a l}^{-1} \text{g}^{-1}$ biomass fresh weight). Hence, the role of microalgae in the lead removal process by *S. minima* could be considered negligible.

The physical and biochemical properties of the *S. minima* biomass grown in a synthetic chemical-defined medium are summarized in Table 1. Carbohydrates made up the largest proportion of the dry weight followed by estimated proteins and only a minor proportion of lipids was found. However, the

Table 1 Physico-chemical characterization of *Salvinia minima*

Parameter	Value
Dry matter (%)	4.12±0.14
Water content (%)	95.88±0.14
Density (g cm^{-3})	0.162±0.018
Water retention ($\text{g water g sorbent}^{-1}$)	4.90±0.25
Surface area ($\text{m}^2 \text{g sorbent}^{-1}$)	264±13
TKN ^a	4.60±0.38
Protein ^a	27.46±0.78
Lipids ^a	1.52±0.05
Total Carbohydrates ^a	48.50±2.17
Ash ^a	13.75±0.008
Total Acidity ^b	3.93±0.09
Carboxylic Acidity ^b	0.95±0.02
Phenolic Hydroxyl Acidity ^b	2.96±0.09

^a Values expressed in % dw.

^b Values expressed in $\text{mmol H}^+ \text{g}^{-1} \text{dw}$

most relevant characteristics were its great surface area (fronds and pseudo-roots) ($264 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) and the significant amount of carboxyl groups ($0.95 \text{ mmol H}^+ \text{ g}^{-1} \text{ dw}$).

3.2 Compartmentalization Analysis

To understand the fate of lead within the experimental microcosm, a compartmentalization analysis was carried out. The highest quantity of Pb^{2+} removed (41–75%) from the water column was found adsorbed onto the biomass surface regardless of the IC and exposure time (Fig. 1a,c). On the contrary, Pb^{2+} was accumulated into the cells in a lower proportion (4–45%) for all tested ICs in each exposure time ($p < 0.05$) (Fig. 1b,d). As expected, the percentages of Pb^{2+} in the water column decreased as the exposure time increased (data not shown) while the Pb^{2+} precipitation (sediments), in general terms, represented 20% or less of the total for both media (data not shown).

3.3 Bioadsorption and Intracellular Accumulation Factors

Bioadsorption and Intracellular Accumulation Factors (BAF and IAF, respectively) were calculated and it was found that BAF were higher than IAF ($p < 0.05$) regardless of IC, medium or exposure time (Fig. 2). In many cases BAF was more than 5 times higher than IAF, despite the fact that such a difference was reduced as the exposure time increased. Although BAF did not show a clear tendency in function of time, these factors were higher than 1000 from the beginning of the removal process, especially at the lower IC tested (0.8 ± 0.00 , 2.70 ± 0.03 and $4.70 \pm 0.06 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$) for both media. On the contrary, increasing behavior was observed in IAF at the higher IC (15.18 ± 0.55 and $28.40 \pm 0.22 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$) since it increased substantially from 0.5 to 8 h and from 8 to 24 h ($p < 0.05$), reaching values higher than 500 after 24 h for both media at an IC of $15.18 \pm 0.55 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$. Regarding the effect of IC over the BAF, it was observed that at the two higher IC levels (15.18 ± 0.55 and $28.40 \pm 0.22 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$) and for the majority of exposure times, lower values were obtained compared to those observed at the lower IC tested ($p < 0.05$) for both media. On the contrary, no differences due to an IC effect over IAF were observed, except at an IC of $0.8 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$ in SWW; these values were higher

than those obtained for the rest of the initial metal concentrations for each exposure time ($p < 0.05$).

3.4 Kinetics and Equilibrium of Lead Adsorption

A clear rise in Pb^{2+} adsorption capacity (q) was observed when IC increased, especially from 15.18 ± 0.55 to $28.40 \pm 0.22 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$ (2.54 and 2.66 fold for SWW and DW, respectively) ($p < 0.05$), reaching an average value as high as $3.81 \pm 0.13\%$ of the dry weight after 24 h for both media (Fig. 3). Along this period, the adsorption process for all ICs did not follow a FOK_s (data not shown); instead it followed an SOK_s model with high determination coefficients (Table 2). The adsorption capacity at the equilibrium (q_e) and the calculated initial adsorption rates (h), increased significantly throughout the IC range ($p < 0.05$) in both media. On the contrary, the rate constant (k_2) decreased clearly when IC increased from 0.8 ± 0.0 to $2.70 \pm 0.03 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$ ($p < 0.05$) and at the highest IC, it reached a very low value. The k_2 and h calculated in SWW were higher than those for DW ($p < 0.05$) at the highest IC.

Data of Pb^{2+} adsorption in the equilibrium (6 h) fitted well the Freundlich and Langmuir isotherms (Table 3). The equilibrium constants obtained (q_{max} , $1/b$, K and n) were significantly higher when Pb^{2+} was adsorbed from a medium amended with propionic acid and magnesium sulfate ($p < 0.05$).

3.5 Intracellular Lead Accumulation

The Pb^{2+} accumulated into the cells showed a sharp increase when the IC rose from 4.70 ± 0.06 to 15.18 ± 0.55 and to $28.40 \pm 0.22 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$ ($p < 0.05$) (Fig. 4). The Pb^{2+} content in the *Salvinia* biomass exposed at $28.40 \pm 0.22 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$ was about 10 times higher than that observed at $0.8 \pm 0.0 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$ during the first 4 h for both media (4226.50 ± 230 vs. 450 ± 70 and 4243 ± 660 vs. $320 \pm 20 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ kg}^{-1} \text{ biomass dw}$ for SWW and DW, respectively). After 24 h of exposure, high intracellular lead levels were obtained ($1.12 \pm 0.081\%$ in SWW and $1.38 \pm 0.14\%$ in DW for an IC of $28.40 \pm 0.22 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$). At this time, *S. minima* was healthy at all ICs tested and did not show toxicity symptoms except at the highest IC ($28.40 \pm 0.22 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$), in which a very small percentage of the fronds turned brown in SWW.

Within the range of ICs tested, the Pb^{2+} intracellular accumulation rates fitted a Michaelis–Menten model for both media (Table 4) and the results showed that the

Fig. 1 Percentage of adsorbed (a, c) and accumulated (b, d) lead in *S. minima* biomass at different exposure times for various initial concentrations of the ion in synthetic wastewater (a, b) and deionized water (c, d)

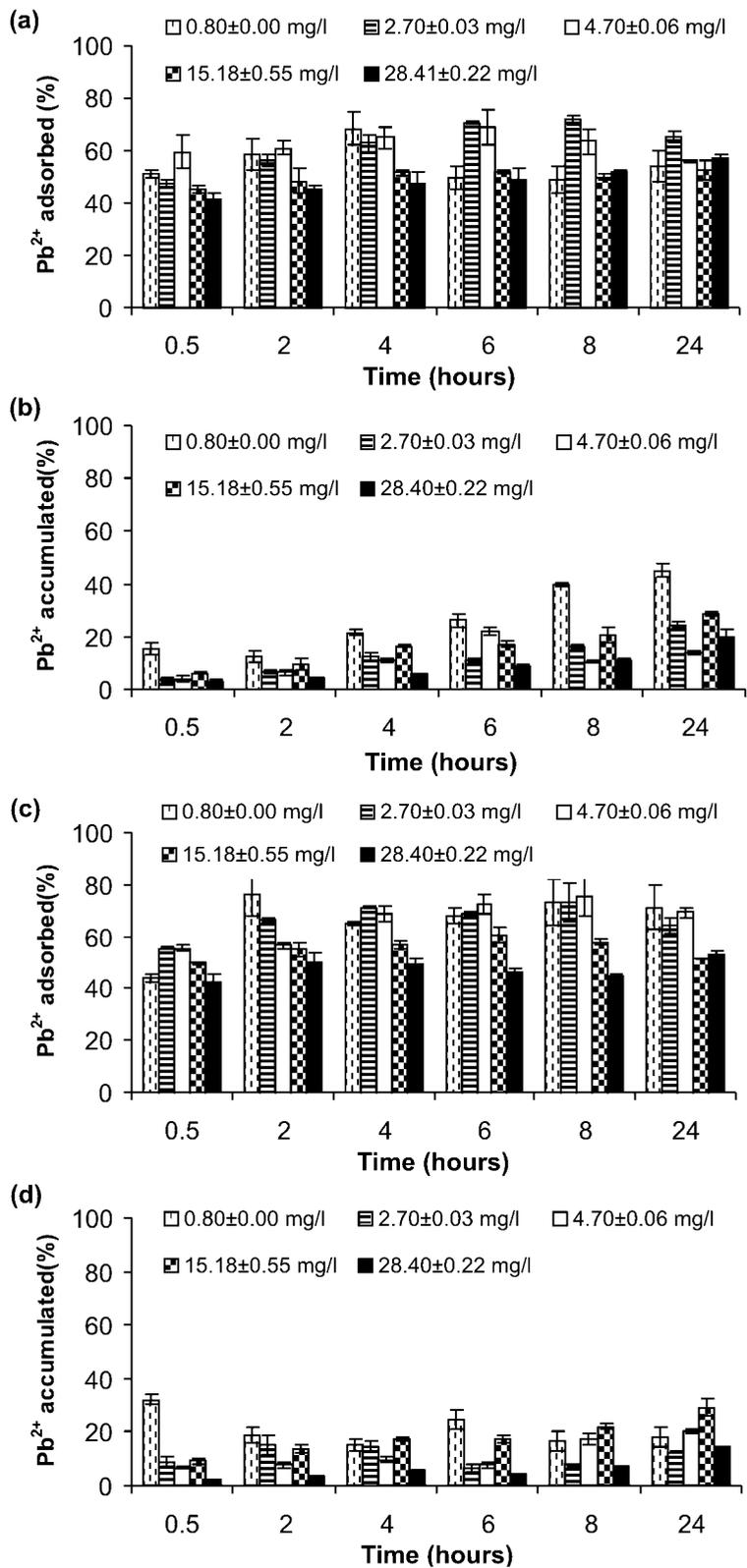


Fig. 2 Bioadsorption Factor (BAF) and Intracellular Accumulation Factor (IAF) of Pb^{2+} in *S. minima* biomass in synthetic wastewater (a, b) and deionized water (c, d) at different concentrations of the ion

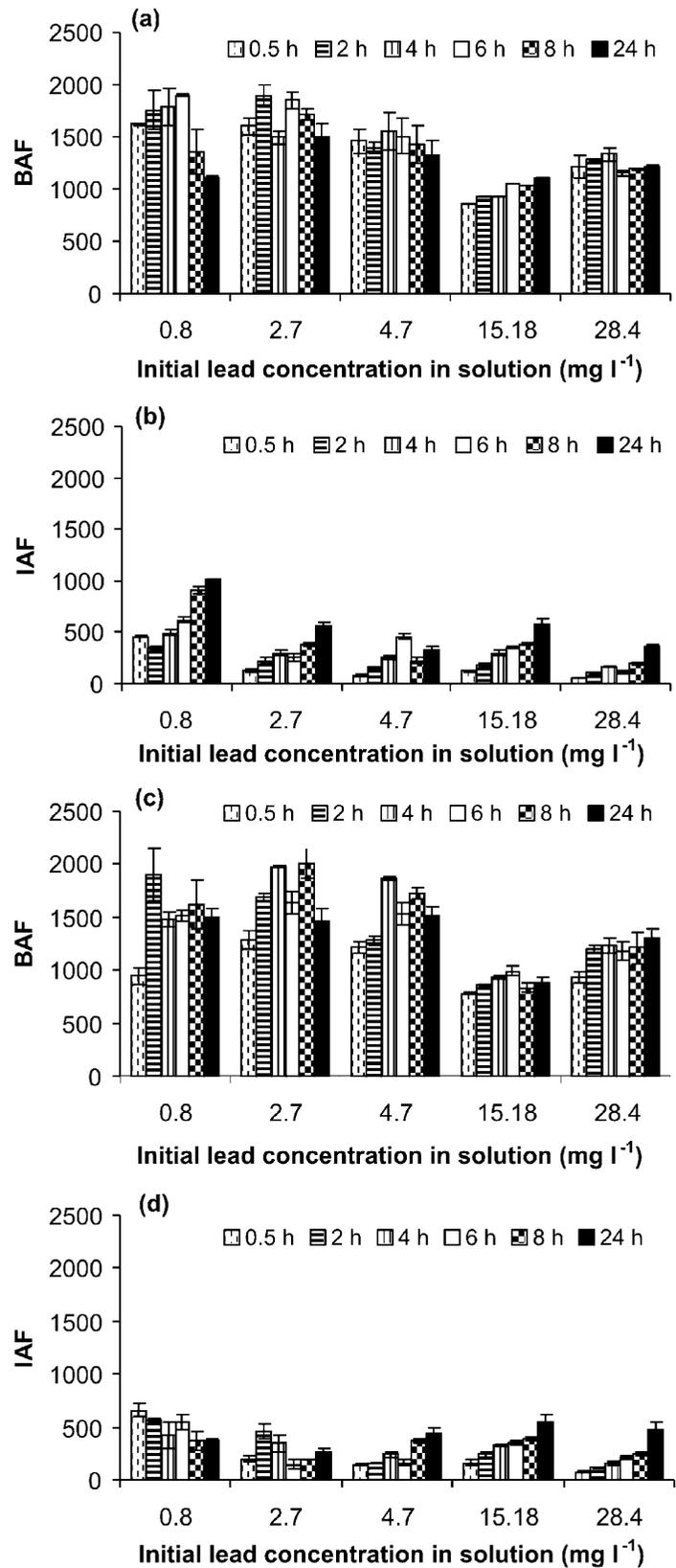
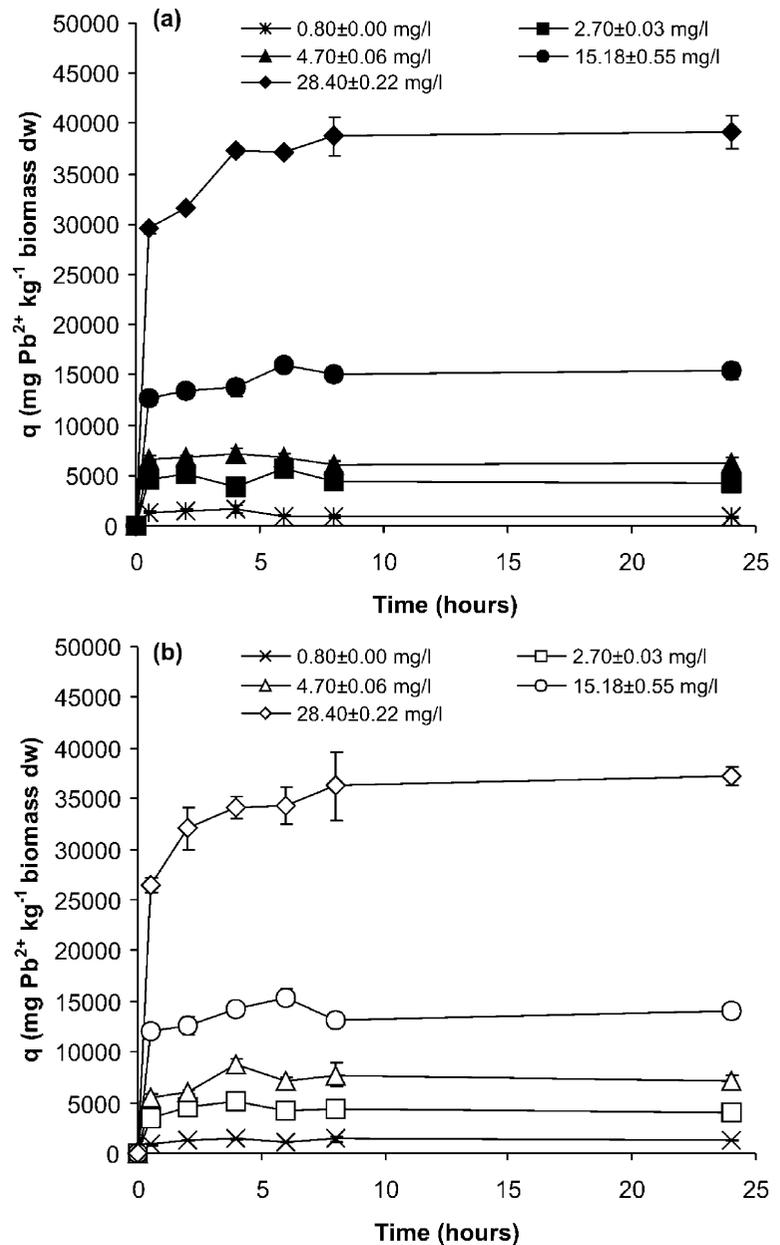


Fig. 3 Lead adsorption capacity (q) of *S. minima* at different initial concentrations of the ion. **a** Synthetic wastewater (SWW). **b** Deionized water (DW)



presence of propionic acid and magnesium sulfate negatively affected the V_{max} calculated for the intracellular Pb^{2+} accumulation by *S. minima* ($p < 0.05$).

4 Discussion

As stated previously, a successful metal phytoremediation partially depends on the surface characteristics of the plant. The content of macromolecules (carbohydrates,

protein, lipids), acidic groups (carboxylic groups), and surface area are key factors which determine the binding mechanism established between metal and biomass. According to the results, *Salvinia* biomass has a great specific surface ($264\ m^2\ g^{-1}$) that is rich in carbohydrates (48.50%) and carboxyl groups ($0.95\ mmol\ g^{-1}$), which explains in part its high metal removal capacity. Carboxylic groups are determinant in metal binding in brown algae and woody subshrubs (Rascon et al. 2000; Davis et al. 2003), while polysaccharide content has

Table 2 Equilibrium adsorption capacity (q_e), rate constant (k_2) and initial rate (h) of Pb^{2+} adsorption by *Salvinia minima* according to the SOK_s model

IC (mg l ⁻¹)	SWW					DW				
	q_e (mg g ⁻¹)	k_2 (g mg ⁻¹ h ⁻¹)	h (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	r^2	p	q_e (mg g ⁻¹)	k_2 (g mg ⁻¹ h ⁻¹)	h (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	r^2	p
0.80±0.00	0.76±0.01	1.31±0.08	0.76±0.07	0.998	<0.001	1.27±0.049	4.91±0.22	7.94±0.24	0.998	<0.001
2.70±0.03	3.98±0.25	0.46±0.002	7.36±0.98	0.997	<0.001	3.90±0.07	0.55±0.02	8.44±0.05	0.999	<0.001
4.70±0.06	5.81±0.047	0.48±0.08	16.23±2.57	0.999	<0.001	6.90±0.33	0.81±0.14	38.44±3.12	0.999	<0.001
15.18±0.55	15.95±0.70	0.21±0.01	52.80±1.77	0.999	<0.001	13.55±0.94	0.19±0.03	41.13±4.40	0.999	<0.001
28.40±0.22	38.61±0.42	0.10±0.01	160.39±12.87	0.999	<0.001	38.03±0.86	0.06±0.011	85.79±10.84	0.999	<0.001

SWW synthetic wastewater, DW deionized water

been reported to influence Pb^{2+} and Cd^{2+} adsorption in *Spirulina* biomass (Hernández and Olguín 2002). Furthermore, the surface area does play a key role in metal sorption in algal and plant cells (Schneider and Rubio 1999; Tien 2002).

In a previous work, we have used a compartmentalization analysis which helps to understand the fate of lead in *Salvinia minima* microcosms (Olguín et al. 2005). In the present work, after performing the compartmentalization analysis, we calculated what we called the Bioadsorption Factor (BAF) and the Intracellular Accumulation Factor (IAF) to quantify separately each of the two major metal uptake mechanisms, adsorption and intracellular accumulation. The results showed clearly that the capacity of *S. minima* to hyperaccumulate lead in batch systems is mainly due to an adsorption phenomenon. The lead values found onto the *S. minima* surface after 24 h of exposure (3.81±0.13% dw) were higher than those found for other lead hyperaccumulators, *Fagopyrum esculentum* (1.7% dw) and *Sesbania drummondii* (roots 2% dw) (Sahi et al. 2002; Tamura et al. 2005). Such a high capacity of *S. minima* to adsorb Pb^{2+} could be explained on the basis of its physico-chemical characteristics described previously. Furthermore, the IAF revealed that the ability of this fern to accumulate lead into the cells, in general terms, was

not affected by the lead concentration in the medium suggesting that the plant developed strategies to accumulate/tolerate lead at higher concentrations.

Other recent efforts (Sundberg-Jones and Hassan 2007) to differentiate sorption and concentration of metals (As, Hg and Se), have involved what the authors call the plant tissue bioconcentration factor, which is related to the concentration of the metal in the whole plant tissues and the plant surface bioconcentration factor, which is the sum of concentrations of metal on roots and submerged shoot surfaces (both of them divided by the concentration of the metal in solution) in emergent macrophytes in wetlands.

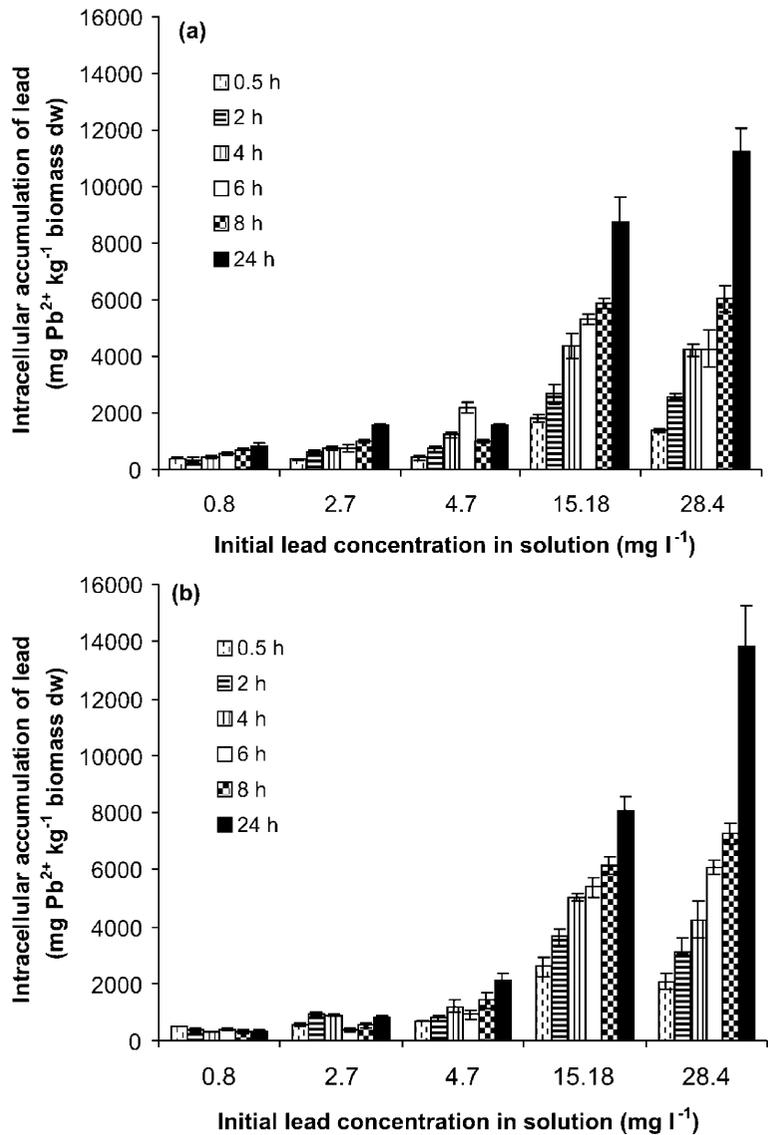
Kinetic and equilibrium models have been used to predict the binding mechanisms of metal adsorption and the maximum adsorption capacity, respectively. In this work data fitted very well the SOK_s model, in which the rate-limiting step is the adsorption mechanism involving chemisorption (Aksu 2001). Thus, it seems feasible to predict that the adsorption mechanism in *S. minima* occurred mainly by ion exchange reactions between the Pb^{2+} ions and the cationic weak exchanger groups present on the plant surface. In fact, it has been reported that ions such as Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{+2} , Fe^{3+} and Mn^{2+} are released to the aqueous solution during the adsorption of Pb^{2+} and Cu^{2+} by *Spirodela intermedia* (Miretzky et al. 2006) and

Table 3 Equilibrium parameters for Pb^{2+} adsorption by *Salvinia minima* according to Freundlich and Langmuir isotherms

Media	Freundlich isotherm			Langmuir isotherm		
	$K(mg g^{-1})(1 mg^{-1})^{1/n}$	n	r^2	q_{max} (mg g ⁻¹)	b (1 mg ⁻¹)	r^2
SWW	9.57±0.12	1.77±0.081	0.985	58.20±1.45	0.14±0.007	0.954
DW	8.31±0.18	1.57±0.108	0.951	44.15±2.55	0.29±0.011	0.988

SWW synthetic wastewater, DW deionized water

Fig. 4 Intracellular accumulation of lead in *S. minima* at different initial concentrations of the ion. **a** Synthetic wastewater (SWW). **b** Deionized water (DW)



Potamogeton lucens (Schneider and Rubio 1999), respectively.

The q_{max} calculated for *S. minima* in SWW ($58.20 \pm 1.45 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ g}^{-1}$) was slightly higher than that found

for *Myriophyllum spicatum* ($55.6 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ g}^{-1}$) (Wang et al. 1996) while the q_{max} obtained in DW was similar to that reported for *Ceratophyllum demersum* ($44.8 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ g}^{-1}$) (Keskinan et al. 2004).

Table 4 Kinetic parameters for intracellular Pb^{2+} accumulation by *Salvinia minima* according to Michaelis–Menten model

Media	V_{max} ($\text{mg g}^{-1} \text{ dw h}^{-1}$)	k_m (mg)	r^2
SWW	1.47 ± 0.11	8.750 ± 1.23	0.952
DW	2.01 ± 0.012	15.69 ± 0.67	0.893

SWW synthetic wastewater, DW deionized water

The fact that the equilibrium parameters calculated in each model (q_{max} , b , K , n) were higher in SWW compared to those observed in DW, might be related to a higher lead bioavailability due to the presence of labile complexes (lead propionate). Commonly, the prediction of metal bioavailability considers the free ion as the major bioavailable species. However, increases in metal availability in the presence of fast dissociating (i.e. labile) metal complexes formed with

natural or synthetic ligands have been reported (Slaveykova and Wilkinson 2002; Degryse et al. 2006). Thus, under the conditions used in our work, Pb-propionate complexes might have been formed in the bulk solution and contributed to a higher lead supply to the *S. minima* surface. Furthermore, Chen and Wu (2004) have found that the maximum Cu^{2+} adsorption capacity of an adsorbent made of activated carbon plus humic acids is higher when citric acid was present in the solution (8.42 vs. 4.83 mg g^{-1}).

The high lead values found into the cells after 24 h of exposure were similar to that reported for the shoots of *S. drummondii* ($1.25 \pm 0.18\%$ dw) exposed to a higher IC ($156 \text{ mg Pb}^{2+} \text{ l}^{-1}$), during two weeks in hydroponics (Sahi et al. 2002). This high capacity of *S. minima* to accumulate and/or tolerate lead in the cells might be related to the synthesis of phytochelators (PCs). Mishra et al. (2006) have reported that the production of PCs is important for lead detoxification by *Ceratophyllum demersum* and that the PC_2 concentration is higher as IC increased. Work is in progress by our research group to investigate PC production as an intracellular mechanism of Pb^{2+} accumulation and tolerance in *S. minima* cells.

Michaelis–Menten model has been used to infer the mechanism responsible for metal transport across the plasma membrane (Abedin et al. 2002). A good fit of the experimental data to this model was obtained, suggesting that lead was transported into the cell through active transport (i.e. membrane transporters) and/or facilitated diffusion (ion channels). Most of the reports dealing with lead transport are related to terrestrial plants (Sunkar et al. 2000; Wang et al. 2007) and little is known about floating aquatic plants (Paganetto et al. 2001). Olgúin et al. (2005) have suggested that in *S. minima*, Pb^{2+} is accumulated intracellularly through the use of calcium channels. Although in our experiments, magnesium was mixed with propionic acid, and no clear evidence of its effect could be drawn from the results, it could be possible that Mg^{2+} negatively affected the Pb^{2+} uptake. Mg^{2+} competition for transport across the plasma membrane during Pb^{2+} uptake into the rice roots, in hydroponics, has been reported (Kim et al. 2002). However, further experimental work needs to be done to test our hypothesis.

Finally, it should be mentioned that *S. minima* satisfies the criteria established to be considered as a lead hyperaccumulator. The BCFs calculated were

higher than 1000 (Zayed et al. 1998) and the lead present on its surface was 38 times ($3.81 \pm 0.13\%$ dw) and that accumulated into the cells was 12.5 times ($1.25 \pm 0.18\%$ dw) higher than the minimum value established for lead hyperaccumulators (0.1% dw) (Baker and Brooks 1989).

5 Conclusions

The BAF and IAF contributed to gain an in-depth insight into the hyperaccumulating lead capacity of *S. minima* while the kinetic models helped to predict the type of adsorption and accumulation mechanisms occurring in the system. It is clear that such capacity is mainly due to adsorption mechanisms most likely as a result of its exceptional physico-chemical characteristics. Additionally, it is expected that these factors should facilitate a more specific comparison of the capacity of different biomass concerning these two uptake mechanisms, regardless of the metal concentration in the aqueous solution.

Acknowledgements This work was financially supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT) through grant P-46697-Z. Ricardo E. González-Portela and Arith Pérez-Orozco are thanked for technical support.

References

- Abedin, M. J., Feldmann, J., & Meharg, A. (2002). Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiology*, *128*, 1120–1128.
- Ahlgren, G., & Merino, L. (1991). Lipid analysis of fresh-water microalgae: a method study. *Archaea Hydrobiologica*, *121*, 295–306.
- Aksu, A. (2001). Biosorption of reactive dyes by dried activated sludge: equilibrium and kinetic modeling. *Biochemical Engineering Journal*, *7*, 79–84.
- AOAC (1990). *Official Methods of Analysis*. Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- Baker, A. J. M., & Brooks, R. R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, *1*, 81–126.
- Chen, J. P., & Wu, S. (2004). Simultaneous adsorption of copper ions and humic acid onto an activated carbon. *Journal of Colloid Interface and Science*, *280*, 334–342.
- Christie, W. W. (1993). Preparation of lipid extracts from tissues. In W. W. Christie (Ed.), *Advances in Lipid Methodology – Two* (pp. 195–213). Dundee: Oily Press.
- Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, *37*, 4311–4330.

- Degryse, F., Smolders, E., & Merckx, R. (2006). Labile Cd complexes increase Cd availability to plants. *Environmental Science & Technology*, *40*, 830–836.
- Flores-Céspedes, F., González-Pradas, E., Fernández-Pérez, M., Villafraña-Sánchez, M., Socias-Viciano, M., & Ureña-Amate, M. D. (2002). Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil. *Journal of Environmental Quality*, *31*, 880–888.
- Furman, N. H. (1975). *Standard Methods of Chemical Analysis*. New York: Krieger Publishing Company.
- Hernández, E., & Olguín, E. J. (2002). Biosorption of heavy metals influenced by the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) biomass. *Environmental Technology*, *23*, 1369–1377.
- Ho, Y. S., & McKay, G. (1999). Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, *34*, 451–465.
- Holm-Hansen, O., & Riemann, B. (1978). Chlorophyll a determination: improvements in methodology. *Oikos*, *30*, 438–447.
- Kaewpravit, C., Hequet, E., Abidi, N., & Gourlot, J. P. (1998). Application of methylene blue adsorption to cotton fiber surface area measurement. *Journal of Cotton Science*, *2*, 164–173.
- Keskinkan, O., Goksu, M. Z. L., Basibuyuk, M., & Forster, C. F. (2004). Heavy metal adsorption properties of a submerged aquatic plant (*Ceratophyllum demersum*). *Bioresource Technology*, *92*, 197–200.
- Kim, Y. Y., Yang, Y. Y., & Lee, Y. (2002). Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiologia Plantarum*, *116*, 368–372.
- Lazaridis, N. K., & Asouhidou, D. D. (2003). Kinetics of sorption removal of chromium (VI) from aqueous solutions by calcined Mg–Al–CO₃ hydrotalcite. *Water Research*, *37*, 2875–2882.
- Madeira, P. T., Jacono, C. C., Tipping, P., Van, T. K., & Center, T. D. (2003). A genetic survey of *Salvinia minima* in the southern United States. *Aquatic Botany*, *76*, 127–139.
- Mallick, N. (2003). Biotechnological potential of *Chlorella vulgaris* for accumulation of Cu and Ni from single and binary metal solutions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *19*, 695–701.
- Miretzky, P., Saralegui, A., & Cirelli, A. F. (2006). Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes. *Chemosphere*, *62*, 247–254.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Kumar, R., Seth, C. S., & Gupta, D. K. (2006). Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, *65*, 1027–1039.
- Noraho, N., & Gaur, J. P. (1996). Cadmium adsorption and intracellular uptake by two macrophytes, *Azolla pinnata* and *Spirodela polyrrhiza*. *Archaea Hydrobiologica*, *136*, 135–144.
- Olguín, E. J., Hernández, E., & Ramos, I. (2002). The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. *Acta Biotechnologica*, *22*, 121–131.
- Olguín, E. J., Rodríguez, D., Sánchez, G., Hernández, E., & Ramírez, M. E. (2003). Productivity, protein content and nutrient removal from anaerobic effluents of coffee wastewater in *Salvinia minima* ponds, under sub-tropical conditions. *Acta Biotechnologica*, *23*, 259–270.
- Olguín, E. J., Sánchez-Galván, G., & Pérez-Pérez, T. (2007). Assessment of the phytoremediation potential of *Salvinia minima* Baker compared to *Spirodela polyrrhiza* in high-strength organic wastewater. *Water Air and Soil Pollution*, *181*, 135–147.
- Olguín, E. J., Sánchez-Galván, G., Pérez-Pérez, T., & Pérez-Orozco, A. (2005). Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of lead in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *32*, 577–586.
- Padmavathiamma, P. K., & Li, L. Y. (2007). Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water Air and Soil Pollution*, *184*, 105–126.
- Paganetto, A., Carpaneto, A., & Gambale, F. (2001). Ion transport and metal sensitivity of vacuolar channels from the roots of the aquatic plant *Eichhornia crassipes*. *Plant Cell & Environment*, *24*, 1329–1336.
- Peer, W. A., Baxter, I. R., Richards, E. L., Freeman, J. L., & Murphy, A. S. (2006). Phytoremediation and hyperaccumulator plants. *Topics in Current Genetics*, *14*, 299–340.
- Prado, A. G. S., Souza, S. M., Lopes da Silva, W. T., & Rezende, M. O. (1999). Development of a filtration and titration method for the determination of the acidity of humic acids. *Química Nova*, *22*, 894–896.
- Rascon, A. E., Tiemann, K. J., Dokken, K., Gamez, G., Parsons, J. G., Chianelli, R., et al. (2000). Study of the binding mechanism of heavy metals by inactivated tissues of *Solanum elaeagnifolium*. In: *Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research* (pp. 361–369). Denver.
- Sahi, S., Bryant, N., Sharma, N., & Singh, S. R. (2002). Characterization of a lead hyperaccumulator shrub, *Sesbania drummondii*. *Environmental Science & Technology*, *36*, 4676–4680.
- Schneider, I. A. H., & Rubio, J. (1999). Sorption of heavy metal ions by the nonliving biomass of freshwater macrophytes. *Environmental Science & Technology*, *33*, 2213–2217.
- Slaveykova, V., & Wilkinson, K. J. (2002). Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science & Technology*, *36*, 969–975.
- Sundberg-Jones, S. E., & Hassan, S. M. (2007). Macrophyte sorption and bioconcentration of elements in a pilot constructed wetland for flue gas desulfurization wastewater treatment. *Water Air and Soil Pollution*, *183*, 187–200.
- Sunkar, R., Kaplan, B., Bouché, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I. N., et al. (2000). Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous *Arabidopsis* CNGG1 gene confer Pb²⁺ tolerance. *The Plant Journal*, *24*, 533–542.
- Tamura, H., Honda, M., Sato, T., & Kamachi, H. (2005). Pb hyperaccumulation and tolerance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Plant Research*, *118*, 355–359.
- Tien, C. J. (2002). Biosorption characteristics of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. *Process Biochemistry*, *38*, 605–613.
- Vermaat, J. E., & Hanif, M. K. (1998). Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and the waterfern *Azolla filiculoides* on different types of waste water. *Water Research*, *32*, 2569–2576.

- Volesky, B. (2003). *Sorption and Biosorption*. Montreal: BV Sorbex Inc.
- Wang, H., Shan, W., Lui, T., Xie, Y., Wen, B., Zhang, S., et al. (2007). Organic acids enhance the uptake of lead by wheat roots. *Planta*, 225, 1483–1494.
- Wang, T. C., Weissman, J. C., Ramesh, G., Varadarajan, R., & Benemann, J. R. (1996). Parameters for removal of toxic heavy metals by water milfoil (*Myriophyllum spicatum*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57, 779–786.
- Zayed, A., Suvarnalatha, G., & Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetlands plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*, 27, 715–721.
- Zhan, X. M., & Zhao, Z. (2003). Mechanism of lead adsorption from aqueous solutions using an adsorbent synthesized from natural condensed tannin. *Water Research*, 37, 3905–3912.

HANDBOOK OF ADVANCED INDUSTRIAL AND HAZARDOUS WASTES TREATMENT

EDITED BY
LAWRENCE K. WANG
YUNG-TSE HUNG
NAZIH K. SHAMMAS



CRC Press
Taylor & Francis Group
Boca Raton London New York

CRC Press is an imprint of the
Taylor & Francis Group, an **Informa** business

CRC Press
Taylor & Francis Group
6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300
Boca Raton, FL 33487-2742

© 2010 by Taylor and Francis Group, LLC
CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business

No claim to original U.S. Government works

Printed in the United States of America on acid-free paper
10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

International Standard Book Number: 978-1-4200-7219-8 (Hardback)

This book contains information obtained from authentic and highly regarded sources. Reasonable efforts have been made to publish reliable data and information, but the author and publisher cannot assume responsibility for the validity of all materials or the consequences of their use. The authors and publishers have attempted to trace the copyright holders of all material reproduced in this publication and apologize to copyright holders if permission to publish in this form has not been obtained. If any copyright material has not been acknowledged please write and let us know so we may rectify in any future reprint.

Except as permitted under U.S. Copyright Law, no part of this book may be reprinted, reproduced, transmitted, or utilized in any form by any electronic, mechanical, or other means, now known or hereafter invented, including photocopying, microfilming, and recording, or in any information storage or retrieval system, without written permission from the publishers.

For permission to photocopy or use material electronically from this work, please access www.copyright.com (<http://www.copyright.com/>) or contact the Copyright Clearance Center, Inc. (CCC), 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, 978-750-8400. CCC is a not-for-profit organization that provides licenses and registration for a variety of users. For organizations that have been granted a photocopy license by the CCC, a separate system of payment has been arranged.

Trademark Notice: Product or corporate names may be trademarks or registered trademarks, and are used only for identification and explanation without intent to infringe.

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

Handbook of advanced industrial and hazardous wastes treatment / edited by Lawrence K. Wang,
Yung-Tse Hung, Nazih K. Shammam.

p. cm. -- (Advances in industrial and hazardous wastes treatment series ; 4)

Includes bibliographical references and index.

ISBN 978-1-4200-7219-8

1. Factory and trade waste--Management--Handbooks, manuals, etc. 2. Industries--Environmental aspects--Handbooks, manuals, etc. I. Wang, Lawrence K. II. Hung, Yung-Tse. III. Shammam, Nazih K. IV. Title. V. Series.

TD897.5.H33 2010
628.4--dc22

2009024421

Visit the Taylor & Francis Web site at
<http://www.taylorandfrancis.com>

and the CRC Press Web site at
<http://www.crcpress.com>

**HANDBOOK OF
ADVANCED INDUSTRIAL
AND HAZARDOUS WASTES
TREATMENT**

ADVANCES IN INDUSTRIAL AND HAZARDOUS WASTES TREATMENT SERIES

Advances in Hazardous Industrial Waste Treatment (2009)
edited by Lawrence K. Wang, Nazih K. Shamma, and Yung-Tse Hung

**Waste Treatment in the Metal Manufacturing, Forming, Coating,
and Finishing Industries (2009)**
edited by Lawrence K. Wang, Nazih K. Shamma, and Yung-Tse Hung

Heavy Metals in the Environment (2009)
edited by Lawrence K. Wang, J. Paul Chen, Nazih K. Shamma,
and Yung-Tse Hung

**Handbook of Advanced Industrial and Hazardous Wastes
Treatment (2010)**
edited by Lawrence K. Wang, Yung-Tse Hung, and Nazih K. Shamma

RELATED TITLES

Handbook of Industrial and Hazardous Wastes Treatment (2004)
edited by Lawrence K. Wang, Yung-Tse Hung, Howard H. Lo,
and Constantine Yapijakis

Waste Treatment in the Food Processing Industry (2006)
edited by Lawrence K. Wang, Yung-Tse Hung, Howard H. Lo,
and Constantine Yapijakis

Waste Treatment in the Process Industries (2006)
edited by Lawrence K. Wang, Yung-Tse Hung, Howard H. Lo,
and Constantine Yapijakis

Hazardous Industrial Waste Treatment (2007)
edited by Lawrence K. Wang, Yung-Tse Hung, Howard H. Lo,
and Constantine Yapijakis

Contents

Preface	ix
Editors	xi
Contributors'	xiii
Chapter 1 Waste Minimization and Cleaner Production	1
<i>Nazih K. Shamma and Lawrence K. Wang</i>	
Chapter 2 Waste Treatment in the Iron and Steel Manufacturing Industry	37
<i>Gupta Sudhir Kumar, Debolina Basu, Yung-Tse Hung, and Lawrence K. Wang</i>	
Chapter 3 Treatment of Nonferrous Metals Manufacturing Wastes	71
<i>Nazih K. Shamma and Lawrence K. Wang</i>	
Chapter 4 Management, Minimization, and Recycling of Metal Casting Wastes	151
<i>An Deng, Yung-Tse Hung, and Lawrence K. Wang</i>	
Chapter 5 Waste Treatment in the Aluminum Forming Industry	197
<i>Lawrence K. Wang and Nazih K. Shamma</i>	
Chapter 6 Treatment of Nickel-Chromium Plating Wastes	231
<i>Lawrence K. Wang, Nazih K. Shamma, Donald B. Aulenbach, and William A. Selke</i>	
Chapter 7 Waste Treatment and Management in the Coil Coating Industry	259
<i>Lawrence K. Wang and Nazih K. Shamma</i>	
Chapter 8 Waste Treatment in the Porcelain Enameling Industry	305
<i>Lawrence K. Wang and Nazih K. Shamma</i>	
Chapter 9 Treatment and Management of Metal Finishing Industry Wastes	343
<i>Nazih K. Shamma and Lawrence K. Wang</i>	

Chapter 10	A Holistic Approach to Phytofiltration of Heavy Metals: Recent Advances in Rhizofiltration, Constructed Wetlands, Lagoons, and Bioadsorbent-Based Systems	389
	<i>Gloria Sánchez-Galván and Eugenia J. Olguín</i>	
Chapter 11	Effects of Metals on Microorganisms in the Environment	409
	<i>Craig R. Worden, Gregory T. Kleinheinz, and Todd R. Sandrin</i>	
Chapter 12	Legislation and Regulations for Hazardous Wastes	429
	<i>Nazih K. Shammass</i>	
Chapter 13	Characteristics of Hazardous Industrial Wastes	485
	<i>Nazih K. Shammass</i>	
Chapter 14	Soil Remediation	519
	<i>Ioannis Paspaliaris, Nymphodora Papassiopi, Anthimos Xenidis, and Yung-Tse Hung</i>	
Chapter 15	Leachate Treatment Using Bioremediation	571
	<i>Azmi Idris, Katayon Saed, and Yung-Tse Hung</i>	
Chapter 16	Remediation of Sites Contaminated by Hazardous Wastes	589
	<i>Lawrence K. Wang, Nazih K. Shammass, Ping Wang, and Robert LaFleur</i>	
Chapter 17	Enzymatic Removal of Aqueous Pentachlorophenol	669
	<i>Khim Hoong Chu, Eui Yong Kim, and Yung-Tse Hung</i>	
Chapter 18	Remediation of Sites Contaminated by Underground Storage Tank Releases	687
	<i>Lawrence K. Wang, Nazih K. Shammass, Ping Wang, and Nicholas L. Clesceri</i>	
Chapter 19	Biological Treatment Processes for Urea and Formaldehyde Containing Wastewater	759
	<i>José Luis Campos Gómez, Anuska Mosquera Corral, Ramón Méndez Pampín, and Yung-Tse Hung</i>	
Chapter 20	Hazardous Waste Deep-Well Injection	781
	<i>Nazih K. Shammass and Lawrence K. Wang</i>	
Chapter 21	Waste Management in the Pulp and Paper Industry	857
	<i>Nazih K. Shammass</i>	

Chapter 22 Waste Treatment in the Inorganic Chemical Industry 913
O. Sarafadeen Amuda, A. Olanrewaju Alade, Yung-Tse Hung, and Lawrence K. Wang

Chapter 23 Incineration and Combustion of Hazardous Wastes 955
Nazih K. Shamma and Lawrence K. Wang

Chapter 24 Remediation from MTBE and Other Fuel Oxygenates 985
Nazih K. Shamma

Chapter 25 Evapotranspiration Landfill Cover 1057
Nazih K. Shamma

Chapter 26 Hazardous Waste Landfill 1093
Nazih K. Shamma and Lawrence K. Wang

Chapter 27 Kinetics and Case Histories of Activated Sludge Secondary Flotation Systems 1155
Lawrence K. Wang, Daniel Guss, and Milos Krofta

Chapter 28 Management and Treatment of Acid Pickling Wastes Containing Heavy Metals 1191
Lawrence K. Wang, Veysel Eroglu, and Ferruh Erturk

Chapter 29 Recycling and Disposal of Hazardous Solid Wastes Containing Heavy Metals and Other Toxic Substances 1213
Lawrence K. Wang

Chapter 30 Food Industry Wastewater Treatment 1233
K.G. Nadeeshani Nanayakkara, Yuting Wei, Yu-Ming Zheng, and Jiaping Paul Chen

Chapter 31 Radon Mitigation in Buildings 1253
Nazih K. Shamma and Lawrence K. Wang

Chapter 32 Treatment of Battery Manufacturing Wastes 1303
Joseph F. Hawumba, Yung-Tse Hung, and Lawrence K. Wang

Index 1333

Preface

Environmental managers, engineers, and scientists who have had experience with industrial and hazardous waste management problems have noted the need for a handbook series that is comprehensive in its scope, directly applicable to daily waste management problems of specific industries, and widely acceptable by practicing environmental professionals and educators.

Many standard industrial waste treatment and hazardous waste management texts adequately cover a few major industries, for conventional in-plant pollution control strategies, but no one book, or series of books, focuses on new developments in innovative and alternative environmental technology, design criteria, effluent standards, managerial decision methodology, and regional and global environmental conservation.

In 2004, CRC Press published the first volume in the series, *Handbook of Industrial and Hazardous Wastes Treatment*. That first handbook emphasized an in-depth presentation of environmental pollution sources, waste characteristics, control technologies, management strategies, facility innovations, process alternatives, costs, case histories, effluent standards, and future trends for each industrial and commercial operation (such as the pharmaceutical industry, oil refineries, metal plating and finishing industry, photographic processing industry, soap and detergent industry, textile industry, phosphate industry, pulp and paper mills, dairies, seafood processing factories, meat processing plants, olive oil processing plants, potato production operations, pesticide industry, livestock industry, soft drink factories, explosive chemical plants, rubber industry, timber industry, and power industry) and an in-depth presentation of methodologies, technologies, alternatives, regional effects, and global effects of each important industrial pollution control practice that may be applied to all industries (such as industrial ecology, pollution prevention, in-plant hazardous waste management, site remediation, groundwater decontamination, and stormwater management).

In a deliberate effort to complement the 2004 handbook as well as other industrial waste treatment and hazardous waste management texts, this 2010 *Handbook of Advanced Industrial and Hazardous Wastes Treatment* covers many new advances in the field of industrial and hazardous waste treatment, such as waste minimization, cleaner production, legislation and regulations for hazardous wastes, hazardous industrial wastes characteristics, soil remediation, brownfield sites restoration, bioremediation, enzymatic process, underground storage tank releases, biological treatment processes, deep-well injection, methyl tertiary-butyl ether, fuel oxygenates, evapotranspiration, landfill cover, hazardous leachate treatment, secondary flotation, solid waste treatment, and so on. This handbook also gives an in-depth presentation of hazardous industrial treatment and management technologies used in many new industries and operations that were not covered in the previous handbook, such as the aluminum forming industry, coil coating industry, nickel-chromium plating plants, porcelain enameling industry, pentachlorophenol processing facilities, pulp and paper industry, and inorganic chemical industry. Many industries are covered for the very first time.

Special efforts were made to invite experts to contribute chapters in their own areas of expertise. Since the field of industrial hazardous waste treatment is very broad, no one can claim to be an expert in all industries; collective contributions are better than a single author's presentation for a handbook of this nature.

This 2010 *Handbook of Advanced Industrial and Hazardous Wastes Treatment* and its sister book, 2004 *Handbook of Industrial and Hazardous Wastes Treatment*, are to be used together as college textbooks as well as reference books for environmental professionals. They feature the

major industries and hazardous pollutants that have significant effects on the environment. Professors, students, and researchers in environmental, civil, chemical, sanitary, mechanical, and public health engineering and science will find valuable educational materials here. The extensive bibliographies for each industrial waste treatment or practice should be invaluable to environmental managers and researchers who need to trace, follow, duplicate, or improve on a specific industrial hazardous waste treatment practice.

A successful modern hazardous industrial waste treatment program for a particular industry will include not only traditional water pollution control but also air pollution control, noise control, soil conservation, site remediation, radiation protection, groundwater protection, hazardous waste management, solid waste disposal, and combined industrial-municipal waste treatment and management. In fact, it should be a holistic environmental control program. Another intention of this handbook series is to provide technical and economical information on the development of the most feasible total environmental control program that can benefit both industry and local municipalities. Frequently, the most economically feasible methodology is a combined industrial-municipal waste treatment.

Lawrence K. Wang, Massachusetts
Yung-Tse Hung, Ohio
Nazih K. Shammas, Massachusetts

face
ent.
and
ive
ital
rial

vill
oil
in-
nt.
ok
le
ly,

ts
o
s

Editors

Lawrence K. Wang has over 25 years of experience in facility design, plant construction, operation, and management. He has expertise in water supply, air pollution control, solid waste disposal, water resources, waste treatment, hazardous waste management, and site remediation. He is a retired dean/director of both the Lenox Institute of Water Technology and Krofta Engineering Corporation, Lenox, Massachusetts, and a retired vice president of Zorex Corporation, Newtonville, New York. Dr. Wang is the author of over 700 technical papers and 24 books, and is credited with 24 U.S. patents and 5 foreign patents. He received his BSCE degree from National Cheng-Kung University, Taiwan; his MS degrees from both the Missouri University of Science and Technology, at Rolla, Missouri, and the University of Rhode Island at Kingston, Rhode Island; and his PhD degree from Rutgers University, New Brunswick, New Jersey.

Yung-Tse Hung has been a professor of civil engineering at Cleveland State University since 1981. He is a fellow of the American Society of Civil Engineers. He has taught at 16 universities in 8 countries. His primary research interests and publications have been involved with biological wastewater treatment, industrial water pollution control, industrial waste treatment, and municipal wastewater treatment. He is now credited with over 450 publications and presentations on water and wastewater treatment. Dr. Hung received his BSCE and MSCE degrees from National Cheng-Kung University, Taiwan, and his PhD degree from the University of Texas at Austin. He is the editor of the *International Journal of Environment and Waste Management*, the *International Journal of Environmental Engineering*, and the *International Journal of Environmental Engineering Science*.

Nazih K. Shammas has been an environmental expert, professor, and consultant for over 40 years. He is an ex-dean and director of the Lenox Institute of Water Technology, and advisor to the Krofta Engineering Corporation, Lenox, Massachusetts. Dr. Shammas is the author of over 250 publications and 12 books in the field of environmental engineering. He has experience in environmental planning, curriculum development, teaching and scholarly research, and expertise in water quality control, wastewater reclamation and reuse, physicochemical and biological treatment processes, and water and wastewater systems. He received his BE degree from the American University of Beirut, Lebanon; his MS from the University of North Carolina at Chapel Hill; and his PhD from the University of Michigan at Ann Arbor.

Contributors

A. Olanrewaju Alade

Department of Chemical Engineering
Ladoke Akintola University of Technology
Ogbomoso, Nigeria

O. Sarafadeen Amuda

Department of Pure and Applied Chemistry
Ladoke Akintola University of
Technology
Ogbomoso, Nigeria

Donald B. Aulenbach

Lenox Institute of Water Technology
Lenox, Massachusetts
and
Rensselaer Polytechnic Institute
Troy, New York

Debolina Basu

Centre for Environmental Science
and Engineering
Indian Institute of Technology Bombay
Mumbai, India

José Luis Campos Gómez

Department of Chemical Engineering
University of Santiago de Compostela
Santiago de Compostela, Spain

Jiaping Paul Chen

Division of Environmental Science
and Engineering
National University of Singapore
Singapore

Khim Hoong Chu

Department of Chemical Engineering
Xian Jiaotong University
Xian, China

Nicholas L. Clesceri

Department of Environmental and Energy
Engineering
Rensselaer Polytechnic Institute
Troy, New York
and
Clesceri Associates, Ltd.
Bolton Landing, New York

An Deng

College of Civil Engineering
Hohai University
Nanjiang, China

Veysel Eroglu

Department of Environmental Engineering
Istanbul Technical University
Istanbul, Turkey

Ferruh Erturk

Department of Environmental Engineering
Yildiz Technical University
Istanbul, Turkey

Daniel Guss

Krofta Engineering Corporation and Lenox
Institute of Water Technology
Lenox, Massachusetts

Joseph F. Hawumba

Department of Biochemistry
Makerere University
Kampala, Uganda

Yung-Tse Hung

Department of Civil and Environmental
Engineering
Cleveland State University
Cleveland, Ohio

Azni Idris

Department of Chemical and
Environmental Engineering
University Putra Malaysia
Serdang, Selangor, Malaysia

Eui Yong Kim

Department of Chemical Engineering
University of Seoul
Seoul, Korea

Gregory T. Kleinheinz

Department of Biology and Microbiology
University of Wisconsin
Oshkosh, Wisconsin

Milos Krofta

Krofta Engineering Corporation and
Lenox Institute of Water Technology
Lenox, Massachusetts

Gupta Sudhir Kumar

Centre for Environmental Science and
Engineering
Indian Institute of Technology Bombay
Mumbai, India

Robert LaFleur

Department of Earth and Environmental
Sciences
Rensselaer Polytechnic Institute
Troy, New York

Ramón Méndez Pampín

Department of Chemical Engineering
University of Santiago de Compostela
Santiago de Compostela, Spain

Anuska Mosquera Corral

Department of Chemical Engineering
University of Santiago de Compostela
Santiago de Compostela, Spain

K.G. Nadeeshani Nanayakkara

Division of Environmental Science
and Engineering
National University of Singapore
Singapore

Eugenia J. Olguín

Environmental Biotechnology Unit
Institute of Ecology
Xalapa, Veracruz, Mexico

Nymphodora Papassiopi

School of Mining Engineering and Metallurgy
National Technical University of Athens
Athens, Greece

Ioannis Paspaliaris

School of Mining Engineering and Metallurgy
National Technical University of Athens
Athens, Greece

Katayon Saed

School of Engineering
Ngee Ann Polytechnic
Singapore

Gloria Sánchez-Galván

Environmental Biotechnology Unit
Institute of Ecology
Xalapa, Veracruz, Mexico

Todd R. Sandrin

Division of Mathematical and
Natural Sciences
Arizona State University
Phoenix, Arizona

William A. Selke

Lenox Institute of Water Technology and
Krofta Engineering Corporation
Lenox, Massachusetts

Nazih K. Shammass

Lenox Institute of Water Technology and
Krofta Engineering Corporation
Lenox, Massachusetts

Lawrence K. Wang

Lenox Institute of Water Technology and
Krofta Engineering Corporation
Lenox, Massachusetts
and
Zorex Corporation
Newtonville, New York

Ping Wang
Center of Environmental Sciences
University of Maryland
Annapolis, Maryland

Yuting Wei
Division of Environmental Science and
Engineering
National University of Singapore
Singapore

Craig R. Worden
Department of Biology and Microbiology
University of Wisconsin
Oshkosh, Wisconsin

Anthimos Xenidis
School of Mining Engineering and
Metallurgy
National Technical University of Athens
Athens, Greece

Yu-Ming Zheng
Division of Environmental Science
and Engineering
National University of Singapore
Singapore

10 A Holistic Approach to Phytofiltration of Heavy Metals: Recent Advances in Rhizofiltration, Constructed Wetlands, Lagoons, and Bioadsorbent-Based Systems

Gloria Sánchez-Galván and Eugenia J. Olguín

CONTENTS

10.1	Introduction	389
10.2	Rhizofiltration	390
10.3	Constructed Wetlands and Lagoons	393
10.3.1	Lagoons with Free-Floating Plants	394
10.3.2	Surface Flow Constructed Wetlands	396
10.3.3	Subsurface Flow Constructed Wetlands	397
10.4	Bioadsorbents-Based Systems	397
10.5	Conclusions	402
	References	402

10.1 INTRODUCTION

Surface water and groundwater may become contaminated with hazardous compounds as a consequence of natural and human activities. Pollutants of concern are both inorganic (heavy metals, radionuclides, nitrogen, phosphorous, etc.) and organic compounds (fuels, solvents, explosives, pesticides, herbicides, chemical and petrochemical compounds, etc.).¹ Organic pollutants are mostly man-made and xenobiotic to organisms. They are released into the environment via spills, military activities, agriculture, industry, wood treatment, and so on. Inorganic pollutants occur as natural elements in the earth's crust or atmosphere, and human activities such as mining, industry, traffic, agriculture, and military activities promote their release into the environment.² Heavy metals and nutrients such as nitrogen and phosphorous are the inorganic pollutants of major concern worldwide.³⁻⁵

The release of heavy metals into the environment presents a serious threat. Over recent decades, the annual worldwide release of heavy metals reached 22,000 T for cadmium, 939,000 T for copper, 783,000 T for lead, and 1,350,000 T for zinc.³ Because of their high solubility in the aquatic environments, heavy metals can be absorbed by living organisms and enter the food chain.⁶ Exposure to high levels of these metals has been linked to cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic effects on

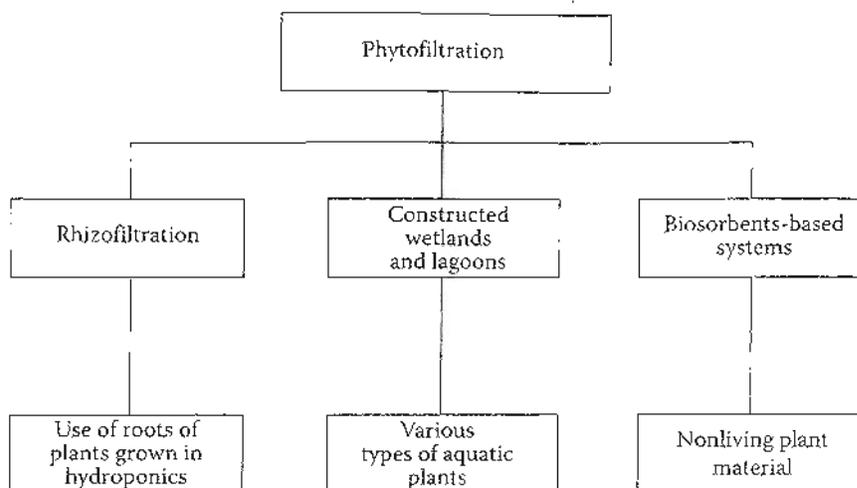


FIGURE 10.1 Different types of systems used in phytofiltration.

human health and wildlife.⁷ As a consequence, their elimination from contaminated waters has become a major topic of research in recent years.⁸

Different technologies have been developed in recent years to treat the wastewaters contaminated with heavy metals. Chemical precipitation, coagulation–flocculation, flotation, ion exchange, and membrane filtration can be employed to remove heavy metals from contaminated wastewater.⁶ However, they have inherent limitations in application mainly due to the lack of economical feasibility for the treatment of large volumes of water with a low metal concentration. Furthermore, the major disadvantage of conventional technologies is the production of sludge.⁹

Due to the above-mentioned constraints of conventional technologies, the biological treatment of metals, especially phytoremediation, is becoming a more attractive alternative. It is defined as the use of plants and their associated microbes to remove, reduce, degrade, or immobilize environmental pollutants from soil and water, thus restoring contaminated sites to a relatively clean, nontoxic environment. A variety of polluted waters can be phytoremediated, including sewage and municipal wastewater, agricultural runoff/drainage water, industrial wastewater, coal pile runoff, landfill leachate, mine drainage, and groundwater plumes. Phytoremediation includes various strategies and all of them are promising, cost-effective, and environmentally friendly technologies.¹⁰

Phytofiltration, a specific strategy of phytoremediation, is the use of plants to remove contaminants from water and aqueous waste streams. Three different systems (Figure 10.1) can be considered within this strategy: (a) rhizofiltration (the use of hydroponically cultivated plant roots),^{3,11,12} (b) constructed wetlands (CWs) and lagoons, and (c) bioadsorbents-based systems.¹

It is worth noting that there are preparation stages of the plant biomass before they can be used for pollutants removal, in the case of rhizofiltration and bioadsorbents-based systems (Figure 10.2), which may increase the investment and operational costs. On the contrary, the lagoons and CWs are designed to process the influents in one single stage.

This chapter is aimed at presenting an overview of the state of the art in phytofiltration of heavy metals using any of the three different treatment systems. It has been considered useful to discuss the three alternatives in one single document, since usually, information for each of the systems is reviewed separately, missing the advantages of a holistic discussion.

10.2 RHIZOFILTRATION

The system or process termed rhizofiltration is the use of hydroponically cultivated plant roots of several terrestrial plants to absorb, concentrate, or precipitate toxic metals from polluted effluents

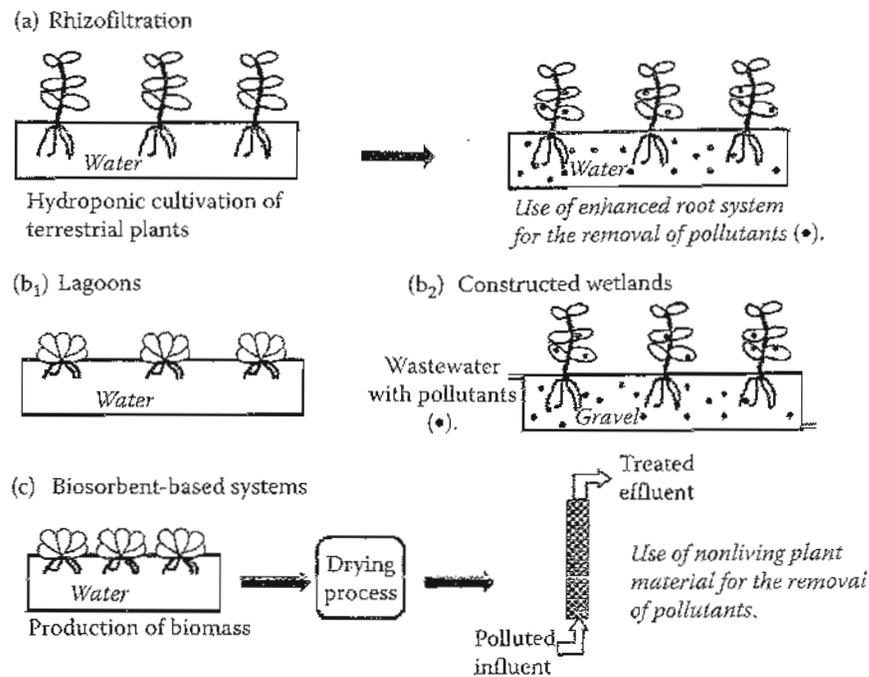


FIGURE 10.2 Preparation and operative stages in rhizofiltration, lagoons, CWs, and biosorbent-based systems.

and was initially promoted by Dushenkov and his group.¹³ An extensive review on this topic and the use of various plants for the removal of heavy metals has been already published.¹⁴ More recently, other reviews have been published, mainly related to modeling systems¹⁵ and radionucleotides removal.¹² Thus, in this chapter, an effort has been made in order to refer only to the more recent work related to the removal of heavy metals through rhizofiltration, in the strict sense of the definition described above, and also in relation to the use of terrestrial plant systems for metal removal from aqueous solutions and wastewaters.

During rhizofiltration, the plant roots sorb, concentrate, and/or precipitate the contaminants present in the irrigated wastewater through the soil plant root system into the harvestable parts of the roots and above-ground shoots.¹⁵ Subsequent volatilization of contaminants can also occur. As they become saturated with the contaminants, roots or whole plants are harvested for disposal. Terrestrial plants are preferred over aquatic plants, since they produce long, more substantial, often fibrous root systems with large surface area for pollutant sorption.³

Roots of many hydroponically grown terrestrial plants, for example, Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.), sunflower (*Helianthus annuus* L.), and various grasses, have proved to remove effectively toxic metals from aqueous solutions. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is one of the most promising environmental crops that is being used in diverse situations for environmental clean-up.¹⁶ It has been shown to be very efficient in the uptake of Cd(II) and Pb(II).¹⁷ The latter was concentrated in both leaf and stem at the region of vascular bundles with greater amounts in the leaf portion. Lead granules were also found in the root tissue from the epidermis layer to the central axis.¹⁸ The influence of a chelating agent such as (S,S)-N,N'-ethylenediamine disuccinic acid (EDDS) on the accumulation of Cu(II), Zn(II), and Pb(II) by sunflowers from nutrient solution has also been assessed. The uptake of Pb(II) in shoots was enhanced, whereas that of essential metals, such as Cu(II) and Zn(II), was decreased. These results show that synthetic chelating agents do not necessarily increase uptake of heavy metals, when soluble concentrations are equal in the presence and absence of chelates.¹⁹

Plant groups such as *Brassica* have members with the ability to extract selenium from soil. *Brassica juncea*, in particular, has been the focus of much research due to its relatively large biomass

and its fast growth cycle.²⁰ In hydroponics, it has shown an exceptionally high accumulation of Pb(II) (138 g/kg) being restricted largely to root tissue. Examination using scanning transmission electron microscopy–energy dispersive spectroscopy revealed substantial and predominantly intracellular uptake at the root tip.²¹ This plant is also able to remove Hg(II) from contaminated solutions. The main removal mechanism was volatilization that occurred from the roots, while only little Hg(II) was translocated to the shoots (0.7–2% of the total metal accumulated).²²

Sedum alfredii has proved to be a Zn/Cd-hyperaccumulator²³ and Pb-accumulating plant.²⁴ Studies developed in hydroponics have suggested that the naturally occurring rhizospheric bacteria may be useful in *S. alfredii* tolerance to heavy metal toxicity, and also accelerate the metal removal from contaminated water.²⁵ The effect of Pb(II) on hyperaccumulating and nonhyperaccumulating ecotypes of this plant has also been evaluated. Although growth, leaf physiology, and ultrastructure of both the ecotypes were affected by Pb treatment, deleterious effects were more pronounced in the nonhyperaccumulating ecotype.²⁶

It is known that lead phytoextraction can be economically feasible only when the developed systems employ high biomass plants that can accumulate >1% of the metal in their shoots. Sahi and coworkers²⁷ demonstrated that *Sesbania drummondii*, a leguminous shrub occurring in the wild, is able to accumulate >4% of Pb(II) in shoots when it is grown hydroponically in a Pb-contaminated nutrient solution. Pb(II) granules were found in the plasma membrane and cell wall, and also in the vacuoles. *S. drummondii* is also able to accumulate Hg(II) from water in roots (998 mg Hg/kg) and shoots (41,403 mg Hg/kg). It has been suggested that this plant uses effective antioxidative defense mechanisms such as the modulating nonenzymatic antioxidants (glutathione and nonprotein thiols) and enzymatic antioxidants: superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase.²⁸

The potential efficiency of *Fagopyrum esculentum*, common buckwheat, in removing chromium from wastewaters has also been assessed. Plants grown in Cr(III) showed a higher tissue concentration and a higher chromium removal efficiency than those grown in Cr(VI). Buckwheat was able to retain their capacity for Cr removal even though it showed strong toxicity symptoms.²⁹

Buddleja asiatica (wild species) and *B. paniculata* (cultivated species) are plants of fast growth, containing an extensive root system. Evaluations under hydroponic conditions were carried out to compare their phytoremediation potential of Cd(II), Zn(II), and Pb(II). *B. asiatica* accumulated more Pb(II) and Cd(II) than *B. paniculata* in both shoots and roots. An extremely high Pb content (12,133–21,667 mg/kg) was observed in roots of both species.³⁰ On the other hand, *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum* are halophytes from Aizoaceae family that show tolerance to Cd(II) in aqueous solutions. It was found that Cd(II) accumulation was significantly higher in the roots than in the shoots. However, the metal content in the shoots reached values characteristic of Cd hyperaccumulator plants (350–700 µg/g).³¹

Pteris vittata, a terrestrial fern, has been described as an As hyperaccumulator.³² Additionally, it has been also grown hydroponically to assess its effectiveness in As removal from contaminated groundwater. Several short-term studies have shown that it is able to reduce effectively the arsenic concentration in 3 d (from 46 to <10 µg/L). After this time, reused plants can continue to take up arsenic from the groundwater but at a slower rate.³³ At field scale, Natarajan and coworkers³⁴ evaluated some factors such as plant density, nitrogen (N) and phosphorous (P) addition, and reuse of plants to improve the effectiveness of *P. vittata* roots system. Results suggested that a higher plant density and lower P levels may enhance the As depletion (from 130 to 1.7 µg/L in five weeks). At the same scale, a continuous flow phytofiltration system with the genus *Pteris* consistently produced water having an arsenic concentration less than the detection limit of 2 mg/L, at flow rates as high as 1900 L/d for a total treated water volume of approximately 60,000 L throughout the 84 d demonstration period.³⁵

Vetiveria zizanioides is a fast growing, perennial, tussock grass belonging to the family Poaceae. It has the ability to extract metals from the soil and water. Its high tolerance for metals and metalloids is often attributed to its capability to accumulate metals in above-ground tissues that do not affect the roots and shoot growth, and to the mycorrhizal association within its roots that makes it

sturdy enough to withstand high toxic metal concentration in soils.³⁶ Boonyapookana and coworkers¹⁸ reported that after four weeks of growth, a 17-fold increase in shoot Pb(II) content was observed in plants grown in a solution containing 2.5 mmol/L of Pb(II) and in the presence of EDTA. A Bioconcentration Factor (BCF) of 88 was obtained.

10.3 CONSTRUCTED WETLANDS AND LAGOONS

An extensive number of manuals and books related to the different aspects of performance and design of CWs are available in the literature.³⁷⁻⁴⁴ On the contrary, reviews concerning metal removal using lagoons with floating macrophytes are scarce. In this review, brief information about CWs is presented and a major emphasis is given to the use of lagoons with aquatic floating plants for metal removal.

CWs are engineered systems that have been designed to treat wastewaters taking advantage of many of the processes that occur in natural wetlands, although its design allows a more controlled environment. Natural processes involve wetland vegetation, soils, and their associated microbial assemblages.⁴⁵ CWs have been used for the purification of domestic, industrial, and agricultural wastewater, and stormwaters. They are furthermore applied to strip nutrients from polluted surface waters before these are discharged into vulnerable nature reserves.⁴¹

Many are the advantages of CWs for treating wastewater and runoff. They are a cost-effective and technically feasible technology. The expenses of operation and maintenance (energy and supplies) are low, requiring only a periodic, rather than continuous, on-site labor. CWs are tolerant to fluctuations in flow and facilitate water reuse and recycling. Additionally, they provide habitat for many wetland organisms and benefits to wildlife habitat.³⁷

In developing countries, additional advantages of using CWs can be obtained. They may provide economic benefits and could encourage small communities to maintain natural wastewater treatment systems. The production of plant biomass can provide economic returns to communities through production of biogas, animal feed, compost, and fiber for paper according to the type of pollutant.⁴⁶

The treatment mechanisms in CWs are numerous and often interrelated. Metals are removed at different stages from the water column by a series of physicochemical and biological processes (Table 10.1).

TABLE 10.1
Mechanisms Involved in the Improvement of the Water Quality in a CW

Mechanism	Type of Process	Pollutant
Settling of suspended particulate matter	Physical	Organic matter
Filtration and chemical precipitation through contact of the water with the substrate and litter	Physicochemical	Metals
Adsorption and ion exchange on the surfaces of plants, substrate, sediment, and litter	Physicochemical	Metals
Direct uptake by plants and microorganisms. Microbial removal of metals	Biological	Metals
Breakdown and transformation of pollutants by microorganisms and plants	Biological	Organics
Uptake and transformation of nutrients by microorganisms and plants	Biological	N, P
Predation and natural die-off of pathogens	Biological	Pathogens

Source: Environmental Protection Agency (EPA), *A Handbook of Constructed Wetlands*. Available at <http://www.epa.gov/OWOW/wetlands/pdf/hand.pdf>, 2000b and Greenway, M., The role of macrophytes in nutrient removal using constructed wetlands, in *Environmental Bioremediation Technologies*, Singh, S.N. and Tripathi, R.D., Eds, Springer, Berlin, Heidelberg, 2007, pp. 331-351.

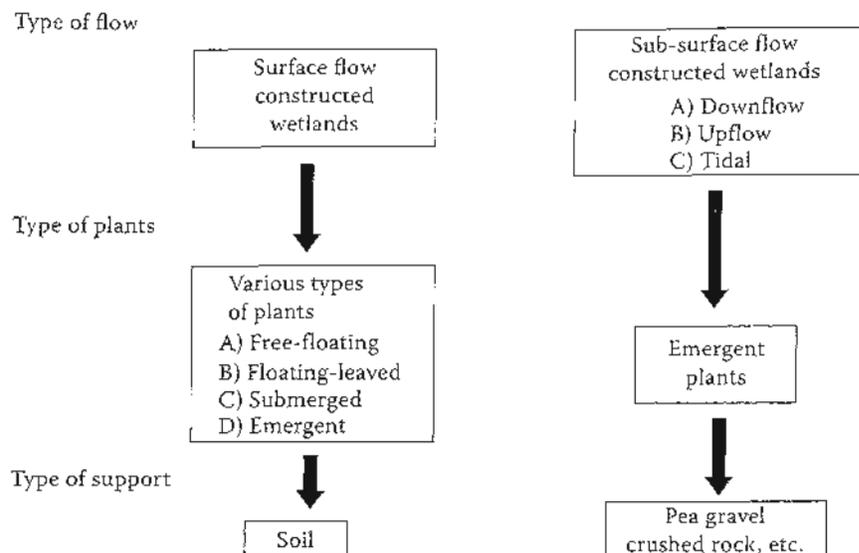


FIGURE 10.3 Types of CWs according to the type of flow, plant, and supporting media.

The basic classification of CWs is based on the type of flow regime and macrophytic growth. In general terms, two types can be described (Figure 10.3). The selection of the most appropriate option shall be according to various operational factors and to the plants available in the region of establishment of the system.^{77,78,40,44}

10.3.1 LAGOONS WITH FREE-FLOATING PLANTS

Lagoons with free-floating macrophytes consist of one or more shallow ponds in which plants float on the surface. Several free-floating plants (FFP) have been tested to purify water by removing nutrients and metals (Table 10.2). They range from large plants with rosettes of aerial and/or floating leaves and well-developed submerged roots to minute surface-floating plants with few or no roots.⁴⁴

The metal removal in this kind of systems is mainly due to plant uptake.^{69,70} Adsorption to the roots or surface plant, translocation, and intracellular accumulation have been described as the main removal mechanisms.^{71,72} The majority of works have been carried out in single-metal microcosms in batch-operated systems. The genus *Azolla* has been widely assessed for removing metals at low initial metal concentrations. Bennicelli and coworkers⁷³ reported that *A. californiana* was able to remove Hg(II) (75–93%) and Cr(III) (74–91%) from synthetic water solutions. The concentration of metals ranged from 71 to 964 mg/kg dry weight in the plant tissues. Similar results for Hg (90%, 94%, and 80%) and Cd(II) (>80%) removal were found using *A. pinnata*. The metal content in the biomass was directly related to that of the solution, being 667 and 740 mg/kg, for Hg(II) and Cd(II), respectively at an initial concentration of 3.0 mg/L. In all cases, the metal presence inhibited the plant growth at 20–30%.⁷⁴ Likewise, *A. filiculoides* is an excellent accumulator of Pb(II) (1.8% of dry weight). More in-depth studies carried out to characterize the mechanisms of such Pb(II) accumulation and storage showed that Pb(II) uptake in *Azolla* leaves takes place in the cell wall and vacuoles. In mature *Azolla* leaves, lead accumulated in larger aggregates than in young leaves. The tonoplasts may be involved in lead accumulation through secondary ion transporters in the vacuoles via H⁺-ATPase activity.⁷⁵

The phytofiltration of Pb(II) and Cd(II) has been also studied using species of *Salvinia*. *S. minima* Baker is a small free-floating aquatic fern native to Mexico, Central America and South America. It has been proved to be an excellent aquatic phytoremediator and hyperaccumulator of Cd(II) and Pb(II).^{72,76} The relevance of using a compartmentalization analysis (CA) complementary to the use of BCFs and metal removal kinetics by plants has been demonstrated using *S. minima*

Table 10.2
Types of Plants Utilized in CWs and Lagoons

	Type of Plants	Reference
Free-floating	<i>Eichhornia crassipes</i>	48
	<i>Pistia stratiotes</i>	49
	<i>Lemnaceae</i>	50
	<i>Azolla filiculoides</i>	51
	<i>Ipomoea aquatica</i>	52
	<i>Bacopa monnieri</i>	53
	<i>Salvinia minima</i>	54
Floating-leaved	<i>Nymphaea spontanea</i>	55
	<i>Nymphaea aurora</i>	56
	<i>Hydrocotyle umbellata</i>	57
Submerged	<i>Nuphar variegatum</i>	58
	<i>Elodea canadensis</i>	59
	<i>Potamogeton natans</i>	59
	<i>Hydrilla</i> sp.	60
	<i>Vallisneria spiralis</i>	61
	Emergent	<i>Phragmites australis</i>
<i>Bolboschoenus maritimus</i>		62
<i>Zizania latifolia</i>		63
<i>Typha latifolia</i>		59
<i>Alisma plantago-aquatica</i>		59
<i>Sagittaria sagittifolia</i> L.		59
<i>Juncus effusus</i>		64
<i>Typha domingensis</i>		65
<i>Phragmites australis</i>		66
<i>Phalaris arundinacea</i>		66
<i>Spartina alterniflora</i>		67
<i>Carex rostrata</i>	68	
<i>Eriophorum angustifolium</i>	68	

exposed to Pb(II) as a model system.⁷² The CA is used to define the fate of the metal within four compartments in the microcosm (surface of the plant, intracellular space, water column, and sediments) by using a series of EDTA washings. Recently, based on the use of this methodological tool, a bioadsorption factor (BAF) and an intracellular accumulation factor (IAF) were proposed in order to gain a full insight into the hyperaccumulating lead capacity of *S. minima*. It was clear that such an ability was mainly due to a strong adsorption capacity (BAF in the range of 780–1980) compared to a weaker one for intracellular accumulation (IAF in the range of 57–1007). Surprisingly, the ability of *S. minima* to accumulate the metal into the cells was not inhibited at concentrations as high as 28.40 ± 0.22 mg Pb(II)/L.⁷⁷

Phetsombat and coworkers⁷⁸ found significant Cd(II) and Pb(II) increases in the accumulation of these two metals by *S. cucullata*, when exposure time (2–8 d) and concentration were increased (from 0.5 to 4.0 and from 5 to 40 mg/L of Cd(II) and Pb(II), respectively). The roots of *S. cucullata* had higher metal contents than leaves suggesting that the metals were bound to the root cells and were partially transported to the leaves. At the same time, there were significant decreases in the relative growth, biomass productivity, and total chlorophyll content when the exposure time and concentration were increased. Other studies have demonstrated the potential of *S. minima* to remediate Cu(II) in concentrations 100 times above that currently found in freshwater environments.⁷⁹

Reports on the evaluation of FFP for metal removal at mesocosms level are scarce. The following discussion provides some of the more relevant reports related to this topic. *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Lemna minor*, *A. pinnata*, and *S. polyrhiza* were tested for their heavy metal removal capacity from the secondary treated municipal wastewater (150 L). Such a wastewater contained metals in various concentrations (mg/L), such as Cr (1.2), Cd (0.09), Cu (0.11), Zn (0.92), Fe (1.8), and Ni (0.07). The aquatic plants showed metal tolerance and surprisingly the secondary treated municipal wastewater promoted their growth. *E. crassipes* was the most efficient accumulator removing up to 70% of Fe(II) and 59% of Ni(II). Metals were mostly accumulated in roots than in leaves, according to the translocation factors, which in general were <1. The highest translocation factor was obtained in *L. minor* for Fe (0.94) and the lowest for Zn in *A. pinnata* (0.48). The biomass produced may be used for biogas production, papermaking, and so on, while treated wastewater may be of possible use for irrigation. Maximum removal at 20 d hydraulic retention period and decreasing trend after that indicate that aquatic plants should be harvested every 20 d for wastewater treatment. This technology is highly recommendable for tropical wastewaters where sewage is mixed with industrial effluents.⁸⁰

Aquatic floating plants have been also tested for the removal of heavy metals from the coal mining effluent in mesocosms. The high removal efficiency (>60% for Fe, Cr, Cu, Cd, and Zn) found when a combination of *E. crassipes* and *L. minor* was used may be due to preferential higher absorption capacities of each plant.⁸¹ Experimental sets containing only *E. crassipes* removed the highest concentration of heavy metals. The translocation factor indicated lower transportation of heavy metals from roots to leaves. A lower accumulation of metals in leaves than in root can be associated with protection of photosynthesis from toxic levels of trace elements.⁸² No symptom of metal toxicity was found; therefore this method can be applied to the large-scale treatment of wastewaters in which metal concentrations are low. The mining effluents treated by this method can be used for various purposes in industry and agriculture or can be safely discharged into surrounding water bodies.⁸¹

Jayaweera and coworkers⁸³ described the different mechanisms involved in the phytoremediation of Fe-rich industrial wastewaters by water hyacinth grown under different nutrient conditions in batch-type lagoons. Fe removal was largely due to an uptake process and chemical precipitation of Fe_2O_3 and $\text{Fe}(\text{OH})_3$ followed by flocculation and sedimentation. Chemical precipitation was more significant especially during the first three weeks of the study. Plants grown without any nutrient addition, other than Fe as a heavy metal, showed the highest removal efficiency of 47% with the highest accumulation of 6707 Fe mg/kg dry weight. Active effluxing of Fe back to the wastewater at intermittent periods was a key mechanism to avoid Fe phytotoxicity in the plant cultivated in all nutrient conditions. It was concluded that water hyacinth grown under nutrient-poor conditions is ideal to remove Fe from wastewaters with a hydraulic retention time of approximately six weeks.

A discussion of the use of floating aquatic plants for metal removal at large scale in surface flow constructed wetlands (SFCWs) is provided below.

10.3.2 SURFACE FLOW CONSTRUCTED WETLANDS

This type of wetlands consists of a shallow sealed basin or sequence of basins, containing 20–30 cm of rooting soil, with a water depth <0.4 m. Dense emergent vegetation covers usually more than 50% of the surface. However, floating-leaved attached macrophytes, that is, plants with roots in the sediment and floating leaves, submerged macrophytes, and floating macrophytes are also found.^{44,47} In tropical regions, treatment wetlands are often dominated by floating aquatic plants rather than emergent macrophytes that are more common in temperate regions.⁸⁴ The most commonly emergent species used for SFCWs are *Phragmites australis* (Common reed), *Typha* spp. (Cattail), *Scirpus* spp. (Bulrush), *Sagittaria latifolia* (Arrowhead), and so on.

The advantages of SFCWs are that their capital and operating costs are low and their construction, operation, and maintenance are not complicated. Their main disadvantage is that they generally require a larger land area than other systems.³⁸

Not many reports on the simultaneous use of different plants in SFCWs are available. Maine and coworkers⁸⁵ reported the treatment of wastewater from a tool manufacturing plant at large scale (100 m³/d). Three floating (*P. stratiotes*, *E. crassipes*, and *S. rotundifolia*) and eight emergent plants (*Cyperus alternifolius*, *P. elephantipes*, *Thalia geniculata*, *Polygonum punctatum*, *Pontederia cordata*, *Pontederia rotundifolia*, *Typha domingensis*, and *Aechmea distichantia*) were transplanted to the CW. Cr, Ni, and Fe concentrations were reduced by 86%, 67%, and 95%, respectively. However, soluble reactive phosphate removal was not efficient. The FeS precipitation probably caused the high retention of Fe (95%). Phosphate and ammonium were not retained within the wetland, while 70% and 60% of the nitrate and nitrite were removed. The assessment of the removal efficiency during the different macrophyte dominance stages was also carried out. During *E. crassipes* dominance, metals were retained in the macrophyte biomass. On the other hand, when *E. crassipes* together with *T. domingensis* were dominant, sedimentation was the main removal mechanism. Finally, during *T. domingensis* dominance stage, pollutants were retained in both sediment and macrophyte biomass. Removal efficiency did not show significant differences among the three vegetation stages even though removal mechanisms were different. Therefore, the choice of the most suitable species depends on the tolerance of the macrophytes to the conditions of the wastewater.⁶⁵

10.3.3 SUBSURFACE FLOW CONSTRUCTED WETLANDS

Subsurface flow wetlands are gravel and/or soil/sand-filled trenches, channels, or basins with no standing water, which support emergent vegetation. They are also known as vegetated submerged bed systems or reed-bed or root-zone wastewater treatment systems.⁴⁷ There are two types of subsurface flow constructed wetlands (SSFCWs), the horizontal flow CW (HFCW) and the vertical flow CW (VFCW). In the HFCW, the wastewater flows slowly through the bed in a relatively horizontal path and comes into contact with a network of aerobic, anoxic, and anaerobic zones. The aerobic zones occur around roots and rhizomes that leak oxygen into the substrate. On the other hand, VFCWs are fed intermittently to flood the surface and wastewater, then gradually percolate down through the bed and are collected by a drainage network at the base. The bed drains freely and it allows air to refill the bed.⁴⁴

The SSFCWs have several advantages over the SFCWs. They have greater cold tolerance, promote a minimization of pest and odor problems, and, possibly, have greater assimilation potential per unit of land area, which results in a smaller requirement of land for the same volume of wastewater. In tropical regions, one of their great advantages is that they do not promote mosquitos proliferation. On the other hand, SSFCWs are more expensive to construct and may be more difficult to regulate than SFCWs. Furthermore, maintenance and repair costs are generally higher. Clogging and unintended surface flows problems have been also reported for this kind of system.³⁸

Metal removal in SSFCWs has been recently focused on metal elimination from synthetic water and different wastewaters,^{66,86} on the evaluation of the effects of season, temperature, plant species, and chemical oxygen demand (COD) loading on metals removal,⁸⁷ and on the accumulation of metals in wetland plant species and sediments.^{88,89} Recent reviews on heavy metal phytoremediation wetlands are also available.⁴⁸

10.4 BIOADSORBENTS-BASED SYSTEMS

Current reviews on biosorption are related to general approaches⁹⁰⁻⁹³ to diverse types of biomass such as microbial biomass, plant wastes, and agro-based waste materials, or to a specific metal.^{4,94-98} However, a review on metal biosorption using macrophytes biomass is not available. In this chapter, a review on the current knowledge of biosorption using preferentially nonliving biomass from aquatic plants is presented.

Biosorption is a property of both living and dead organisms and may be simply defined as the removal of substances from solution by biological material. Such substances can be organic and

inorganic, and in gaseous, soluble, or insoluble forms.⁹³ Biosorption has shown to be a very promising biotechnology for metal removal from effluents.⁹⁰ Its major advantages are its low cost, high metal-binding capacity, high efficiency for reducing quickly the pollutant concentration in an environmentally friendly manner, simplicity, and availability of biomass.^{93,99,100}

Ahluwalia and Goyal⁹⁴ have pointed out some disadvantages of biosorption such as the early saturation of biomass, which can be a problem since metal desorption is necessary prior to further use, irrespective of the metal value. Furthermore, the potential for biological process improvement is limited because cells are not performing an active metabolism.

Biosorption is a rather complex process affected by several factors that include different binding mechanisms (Figure 10.4). Most of the functional groups responsible for metal binding are found in cell walls and include carboxyl, hydroxyl, sulfate, sulfhydryl, phosphate, amino, amide, imine, and imidazol moieties.^{4,90} The cell wall of plant biomass has proteins, lipids, carbohydrate polymers (cellulose, xylane, mannan, etc.), and inorganic ions of Ca(II), Mg(II), and so on. The carboxylic and phosphate groups in the cell wall are the main acidic functional groups that affect directly the adsorption capacity of the biomass.¹⁰¹

Additionally, studies about chemical modification of the biomass surface to improve biosorption have been widely reported.^{102,103} Equilibrium⁹¹ and kinetics¹⁰⁴ biosorption have been described using different models.

Recent reports on biosorbents based on diverse types of macrophytes are found widely in the literature. Free-floating aquatic plants from the genera *Salvinia*, *Azolla*, *Eichhornia*, *Lemna*, and *Pistia* have been described the most. *S. natans* biomass was able to uptake As(V) at low initial concentrations from 0.25 to 2 mg/L (74.8% and 54%, respectively). The experimental data fitted well to both Langmuir and Freundlich isotherms. The effect of pH and biomass quantities on sorption rate has also been investigated along with some metabolic parameters.¹⁰⁵

Recently, nonliving biomass of *S. cucullata* has been described as a low-cost absorbent of Cr(VI).¹⁰⁶ Optimum conditions for the Cr(VI) adsorption by acid-treated *S. cucullata* were found out using a full factorial design. The Cr(VI) removal efficiency of the adsorbent was found to increase with the increase in time, temperature, adsorbate concentration, and stirring speed, and to decrease with increase in pH and adsorbent dose. The Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) analysis revealed that in addition to electrostatic force, the adsorption may be due to

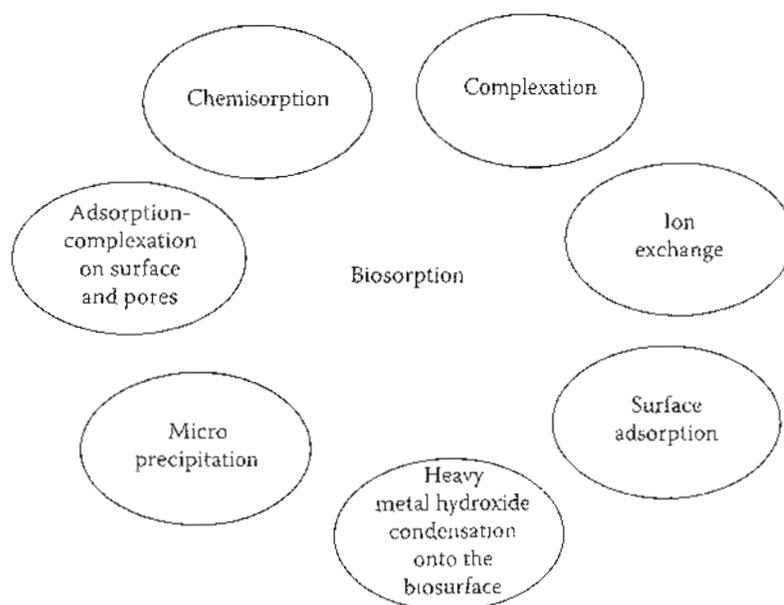


FIGURE 10.4 Binding mechanisms involved in metal biosorption.

formation of complex with the ligands (Lewis bases) available in the adsorbents. The vital role played by chelation was also shown. Authors suggest that the formation of chelates could have been favored at lower pHs and therefore the adsorption efficiency was higher. Column studies were carried out at the optimum operating conditions and the maximum uptake obtained was 98.75 mg/g. Adsorption data from the column studies fitted well to the Bohart-Adams model. Furthermore, Cr(VI) removal studies were carried out by using activated carbon obtained from *S. cucullata*. Results showed that the initial part of the adsorption process confined only to surface adsorption and the slower kinetics could be due to intraparticle diffusion. The FT-IR showed the anionic binding with the chelate forming part of the adsorbent. Column studies were also carried out to evaluate the suitability of the adsorbent in treating Cr(VI)-contaminated water and the maximum uptake of Cr(VI) observed was 156 mg/g at an initial concentration of 100 mg/L.¹⁰⁷

A. fliculoides biomass has been evaluated for Pb(II), Cd(II), Ni(II), and Zn(II) adsorption in different stages. Nonliving biomass of *A. fliculoides* was activated by NaOH and then CaCl₂/MgCl₂/NaCl. This process can occur due to the increase of ion-exchange agents such as (-COO)₂Ca and (-COO)₂Mg bindings and/or -COONa₂OOC- groups. These binding sites can be formed from demethylation of cell wall pectin in the alkali solution and then contacting with ternary chloride salts solution. Such an activation resulted in a higher q_{max} obtained for the alkali-treated biomass, especially for Pb(II) and Cd(II) at the highest temperature (313°K) (1.272 versus 0.977 and 1.35 versus 0.931 for Pb(II) and Cd(II), respectively). This biomass had also faster adsorption kinetics in comparison to the nonactivated *Azolla* biomass.¹⁰⁸

Removal of Hg(II) from aqueous solutions has been also possible using *A. fliculoides* nonliving biomass. Diverse techniques such as scanning electron microscopy (SEM), determination of nitrogen and amino acid content, BET (Brunauer, Emmett, Teller) surface area by N₂ adsorption at 77 K, acid/base titration, ion-exchange capacity, and electrophoretic measurements were used in an attempt to elucidate the mechanisms involved in mercury sequestration. Samples were also characterized by energy dispersive spectroscopy and x-ray diffraction after contact and equilibration with mercury solution. The reduction of Hg(II) to Hg(I), that is, soluble mercuric to insoluble mercurous chloride (Hg₂Cl₂) on the adsorbent surface, was found to be a controlling reaction mechanism. Although mercury sorption was studied at elevated concentrations similar to those encountered in industrial effluents, it is suggested that the findings would also apply to final stage water treatment.¹⁰⁹

Less complex techniques have been reported to be useful to study the acidic and alkaline treatment processes of biosorbents and the role of carboxyl and carboxylate groups in metal adsorption. Rakhshae and coworkers¹⁰¹ used potentiometric titration curves to assess the content of such groups in *L. minor* biomass treated with NaOH and HCl. The results showed an increase (up to 25%) in the adsorption of Hg(II), Cr(III), Cr(VI), and Cu(II) with NaOH-treated biomass as a consequence of an increase of -COO- groups (0.92-2.42 mmol/g). On the contrary, the -COOH groups increase observed (1.50-2.41 mmol/g) due to the acidic treatment led to a decrease in the metal ions uptake (up to 33%) despite activation by the chloride salts.

Recent reports pointed out that water hyacinth (*E. crassipes*) nonliving biomass is suitable for development of an efficient biosorbent for the removal of chromium from wastewater of chemical and allied process industries. Gude and Das¹¹⁰ found that the adsorption rate of Cr(VI) from aqueous solutions was rapid following the first-order kinetic model and the equilibrium exhibited a Langmuir-type behavior. The maximum Cr(VI) adsorption was found to be 7.5 mg/g of dry weight, whereas the calculated activation energy was around 54.6 kJ/mol. Based on these results, the authors mentioned that about 500 mg of dry biomass could remove Cr(VI) successfully from 100 mL of chromite mine water containing 2.8 mg/L Cr(VI). On the contrary, it has been reported¹¹¹ that although the Lagergren first-order model was applicable to some of the data of Cr(VI) adsorption by water hyacinth biomass, the pseudo-second-order reaction model was applicable to all data. Furthermore, the Freundlich isotherm was found to represent the measured sorption data well. The FT-IR showed that the hydroxyl group was the chromium-binding site within a pH range from 1 to 5, where chromium did not precipitate.

Spirodela intermedia, *L. minor*, and *P. stratiotes* were able to remove Pb(II), Cd(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II), although the two former ions were removed more efficiently. Data fitted the Langmuir model only for Ni and Cd, but the Freundlich isotherm for all metals tested. The adsorption capacity values (K_F) showed that Pb was the metal more efficiently removed from water solution (166.49 and 447.95 mg/g for *S. intermedia* and *L. minor*, respectively). The adsorption process for the three species studied followed first-order kinetics. The mechanism involved in biosorption resulted in an ion-exchange process between monovalent metals as counterions present in the macrophytes biomass and heavy metal ions and protons taken up from water.¹¹²

The effect of activation treatments has been also evaluated in multimetal (Cu(II), Cd(II), and Ni(II)) systems using untreated, acid pretreated (H_2SO_4), and alkali pretreated (NaOH) biomass of *L. minor*. The results revealed that the adsorption capacities of the biomass in multimetal systems were lower than those obtained in a single-metal system, that is, Cd(II) adsorption decreased by almost 60% in the untreated biomass. The ionic charge, ionic radii, and electrode potential affect metal ions adsorption in the multimetal systems. On the other hand, the maximum adsorption capacities were higher with alkali pretreated biomass (83, 69, and 59 mg/g for the Cd(II), Cu(II), and Ni(II) ions, respectively). The FT-IR results showed that dried biomass have different functional groups for heavy metal ions binding, such as carboxyl, phosphate, amide, thiol, and hydroxide groups.¹¹³

Nonliving biomass of *E. crassipes*, *Valisneria spiralis*, and *P. stratiotes* were examined in terms of their heavy metal (Cd(II), Ni(II), Zn(II), Cu(II), Cr(II), and Pb(II)) sorption capacity, from individual-metal and multimetal aqueous solutions. Surprisingly, *V. spiralis* was the most efficient plant and *E. crassipes* was the least efficient one for removal of all the metals. Cd(II) was removed up to 98% by *V. spiralis*. Sorption data for Cr(II), Ni(II), and Cd(II) fitted better to the Langmuir isotherm equation, while the sorption data for Pb(II), Zn(II), and Cu(II) fitted better to the Freundlich isotherm equation. In general, the presence of other metal ions did not influence significantly the targeted metal sorption capacity of the test plant biomass. Ion exchange was proven to be the main mechanism involved in biosorption and there was a strong ionic balance between adsorbed (H^+ and M^{2+}) and the released ions (Na^+ and K^+) to and from the biomass.¹¹⁴

Regarding submerged plants, sorption of Cu(II) by *Myriophyllum spicatum* L. (Eurasian water milfoil) has been shown to be fast and fits isotherm models such as Langmuir, Temkin, and Redlich-Peterson. The maximum sorption capacity (q_{max}) of copper onto *M. spicatum* L. was 10.80 mg/g, while the overall sorption process was best described by the pseudo-second-order equation.¹¹⁵ Likewise, *Hydrilla verticillata* has been described as an excellent biosorbent for Cd(II). In batch conditions, the q_{max} calculated was 15.0 mg/g. Additionally, *H. verticillata* biomass was capable of decreasing Cd(II) concentration from 10 to a value below the detection limit of 0.02 mg/L in continuous flow studies (fixed-bed column). It was also found that the Zn ions affected Cd(II) biosorption.¹¹⁶

Sorption mechanisms of Hg(II) by the nonliving biomass of *Potamogeton natans* was also elucidated using chemical and instrumental analyses including atomic absorption, electron microscopy, and x-ray energy dispersion analyses. The results showed a high maximum adsorption of Hg(II) (180 mg/g), which took place over the entire biomass surface. Nevertheless, there were spots on the surface where apparent multilayer sorption of Hg(II) occurred. The minimum concentration of Hg(II) in solution that can be removed appears to be about 4–5 mg/L.¹¹⁷

Other aquatic weeds such as reed mat, mangrove (leaves), and water lily (Nymphaeaceae family plants) have been found to be promising biosorbents for chromium removal. The highest Cr(III) adsorption capacity was exhibited by reed mat (7.18 mg/g), whereas for Cr(VI), mangrove leaves showed maximum removal capacity (8.87 mg/g) followed by water lily (8.44 mg/g). It is interesting to mention that Cr(VI) was reduced to Cr(III), with the help of tannin, phenolic compounds, and other functional groups on the biosorbent, and subsequently adsorbed. Unlike the results discussed previously for the use of acidic treatments, in this case, such treatments significantly increased the Cr(VI) removal capacity of the biosorbents, whereas the alkali treatment reduced it.¹¹⁸

Lichen biomass from *Parmelina* and *Cladonia* genera have resulted good biosorbents of Pb(II), Cr(III), and Ni(II) ions. The Langmuir, Freundlich, and Dubinin-Radushkevich (D-R) models

were applied to describe the biosorption isotherm of Pb(II) and Cr(III) ions by *Parmelina tiliaceae* biomass. The monolayer biosorption capacity of the lichen found for Pb(II) and Cr(III) ions was 75.8 and 52.1 mg/g, respectively. The D-R isotherm model indicated that the biosorption was carried out by a chemical ion-exchange mechanism, since the mean free energy calculated was 12.7 and 10.5 kJ/mol for Pb(II) and Cr(III) biosorption, respectively. The calculated thermodynamic parameters such as the change of free energy (ΔG°), enthalpy (ΔH°), and entropy (ΔS°) showed that the biosorption of Pb(II) and Cr(III) ions onto *P. tiliaceae* biomass was feasible, spontaneous, and exothermic under the examined conditions.¹¹⁹ The equilibrium, thermodynamic, and kinetic models mentioned before were also used to describe the biosorption of Pb(II) and Ni(II) ions from aqueous solution using *Cladonia furcata* biomass. The monolayer biosorption capacity of the biomass was found to be 12.3 and 7.9 mg/g for Pb(II) and Ni(II) ions, respectively. From the D-R model, the mean free energy calculated was 9.1 kJ/mol for Pb(II) biosorption and 9.8 kJ/mol for Ni(II) biosorption, indicating that the biosorption of both metal ions was carried out by a chemical ion-exchange mechanism. Thermodynamic parameters related to the biosorption capacity indicated the occurrence of a feasible, spontaneous, and exothermic process. Experimental data were also tested in terms of kinetic characteristics and it was found that biosorption processes of both metal ions followed well pseudo-second-order kinetics.¹²⁰

Finally, Chojnacka¹²¹ investigated the biosorption characteristics of *Riccia fluitans* and its potential to adsorb Cr(III) from aqueous solutions. The results showed that the biomass was rich in protein (27–31%) and possessed a high cation-exchange capacity (14.5 mequiv/g). The carboxyl groups were found in a higher quantity (6.08 mequiv/g). Additionally, it was found that in multi-ion systems (Cu, Mn, and Zn), the Cr(III) biosorption capacity was significantly affected (3.91 versus 6.10 mequiv/g) since metal ions competed for metal-binding sites. The results also showed that bound metal ions were exchanged with alkaline earth metals, confirming that the dominating mechanism of metal binding by *R. fluitans* was ion exchange.

As was mentioned earlier in this chapter, most of the biosorption reviews deal with nonliving biomass. However, it is also relevant to understand the presence of various biosorption mechanisms when metabolism is active, using living biomass. *S. minima* has proven to be an excellent Pb biosorbent. The biosorption process was found to follow a pseudo-second-order kinetics and to be dependent on the initial metal concentration (from 0.8 to 28.40 mg Pb/L). Data fitted well both the Langmuir and the Freundlich models. Very high q_{\max} were obtained for both, synthetic wastewater and deionized water (58 and 44 mg/g, respectively). Such a high capacity to adsorb Pb was most likely due to its exceptional physicochemical characteristics such as a very high surface area (264 m²/g) and a good content of carboxylic groups (0.95 mmol H⁺/g dry weight).⁷⁷

In natural conditions, *Ceratophyllum demersum* and *Potamogeton pectinatus* L. have been found to be effective adsorbents of Cd(II), Cu(II), and Pb(II). The adsorption percentage of the metals onto plant surfaces followed the pattern: Pb(II) > Cu(II) > Cd(II). *P. pectinatus* biomass adsorbed a higher content of heavy metals than *C. demersum*. According to the results, both species are of interest in the phytoremediation and biomonitoring studies of polluted waters.¹²²

In controlled conditions, Lesage and collaborators¹²³ assessed the sorption/desorption properties of Co, Cu, Ni, and Zn by living *Myriophyllum spicatum* biomass. The sorption process was well described by the Langmuir model for Co, Ni, and Zn, whereas sorption of Cu was better described by the Freundlich isotherm. The biomass showed the highest affinity for Cu being the maximum sorption capacity (113 mg/g), 49-, 38-, and 17-fold that of Co, Ni, and Zn (2.3, 3.0, and 6.8 mg/g, respectively). At the highest initial concentration of 100 mg/L, a maximum of 29 mg/g of Cu was sorbed onto the surface of the biomass. The potential regeneration of the biomass and the recovery of heavy metals were also evaluated using HCl (0.1 M). However, the acid wash did not fully recover the metals sorbed onto the surface and evidence of leaching within the biomass was observed. Therefore, this procedure was not suggested as a viable strategy. On the other hand, Keskinan and collaborators¹²⁴ found a lower q_{\max} for Cu(II) (10.37 mg/g) and Zn(II) (15.59 mg/g) removal using the living biomass of *M. spicatum*. On the contrary, both *M. spicatum* and *C. demersum* showed to

be excellent Pb(II) adsorbents ($q_{max} = 46.49$ and 44.8 mg/g, respectively). The thermodynamic parameters, specifically, the Gibbs free energy with negative values, indicated the spontaneity of the adsorption process between metals and plants. The lowest value was obtained for copper and the *C. demersum* system (-0.45), while the highest value of this parameter was achieved for lead and the *M. spicatum* system (-10.83).

10.5 CONCLUSIONS

Phytofiltration, defined as the use of plants to remove pollutants from wastewaters, has proven to be an efficient and environmentally friendly biotechnology. All phytofiltration systems, such as rhizofiltration, CWs and lagoons, and biosorbents-based systems, are very efficient in metal removal. However, the selection of the appropriate plant species and/or a specific system of phytofiltration is critical for a successful application at field scale. Aquatic plants, especially the free-floating and submerged plants, have shown a great potential in this area. Finally, even though most of the removal mechanisms of such pollutants have been studied, a better understanding of them within a particular system will be necessary for increasing the cases of successful applications of phytofiltration.

REFERENCES

1. Arthur, E.L., Rice, P.J., Rice, P.J., Anderson, T.A., Baladi, S.M., Henderson, K.L.D., and Coats, J.R., Phytoremediation—an overview. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, 109–122, 2005.
2. Pilon-Smits, E., Phytoremediation. *Annual Review Plant Biology*, 56, 15–39, 2005.
3. Padmavathiamma, P.K. and Li, L.Y., Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants, *Water, Air, and Soil Pollution*, 184, 105–126, 2007.
4. Demirbas, A., Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review. *Journal of Hazardous Material*, 157, 220–229, 2008.
5. Hu, M.H., Ao, Y.S., Yang, X.E., and Li, T.Q., Treating eutrophic water for nutrient reduction using an aquatic macrophyte (*Ipomoea aquatica* Forsskal) in a deep flow technique system, *Agricultural Water Management*, 95, 607–615, 2008.
6. Kurniawan, T.A., Chan, G.Y.S., Lo, W., and Babe, S., Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, 118, 83–98, 2006.
7. Prasad, M.N.V., Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: Hype for commercialization, *Russian Journal of Plant Physiology*, 50 (5), 686–700, 2003.
8. Oliveira, W.E., Franca, A.S., Oliveira, L.S., and Rocha, S.D., Untreated coffee husks as biosorbents for the removal of heavy metals from aqueous solutions, *Journal of Hazardous Materials*, 152, 1073–1081, 2008.
9. Doshi, H., Ray, A., and Kothari, I.L., Bioremediation potential of *Chlorella*: Spectroscopic, kinetics, and SEM studies. *International Journal of Phytoremediation*, 10, 264–277, 2008.
10. Pilon-Smits, E. and Freeman, J.L., Environmental cleanup using plants: Biotechnological advances and ecological considerations, *Frontiers in Ecology and Environment*, 4 (4), 203–210, 2006.
11. Baldwin, P.R. and Butcher, D.J., Phytoremediation of arsenic by two hyperaccumulators in a hydroponic environment. *Microchemical Journal*, 85, 297–300, 2007.
12. Dushenkov, V., Kumar, N.P.B.A., Motto, H., and Raskin, I., Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams, *Environmental Science and Technology*, 29, 1239–1245, 1995.
13. Dushenkov, S. and Kapulnik, Y., Phytofiltration of metals, in *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*, Raskin, I. and Ensley, B.D., Ed. Wiley-Interscience, New York, 2000, pp. 89–106.
14. Dushenkov, S., Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant and Soil*, 249, 167–175, 2003.
15. Verma, K.V., George, H.V., Singh, S.K., Singh, A., Juwarkar, A., and Singh, R.N., Modeling rhizofiltration: Heavy-metal uptake by plant roots. *Environmental Modeling and Assessment*, 11, 387–394, 2006.
16. Prasad, M.N.V., Sunflower (*Helianthus annuus* L.)—A potential crop for environmental industry, *HELIA*, 30 (46), 167–174, 2007.
17. Niu, Z.X., Sun, L.N., Sun, T.H., Li, Y.S., and Wang, H., Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 961–967, 2007.

18. Boonyapookana, B., Parkplan, P., Techapinyawat, S., DeLaune, R.D., and Jugsujinda, A., Phytoaccumulation of lead by sunflower (*Helianthus annuus*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), and vetiver (*Vetiveria zizanioides*), *Journal of Environmental Science and Health Part A—Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 40 (1), 117–137, 2005.
19. Tandy, S., Schulin, R., and Nowack, B., The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers, *Chemosphere*, 62, 1454–1463, 2006.
20. Vonderheide, A.P., Mounicou, S., Meija, J., Henry, H.F., Caruso, J.A., and Shann, J.R., Investigation of selenium-containing root exudates of *Brassica juncea* using HPLC-ICP-MS and ESI-qTOF-MS, *Analyst*, 131, 33–40, 2006.
21. Meyers, D.E.R., Auchterlonie, G.J., Webb, R.I., and Wood, B., Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*, *Environmental Pollution*, 153, 323–332, 2008.
22. Moreno, F.N., Anderson, C.W.N., Stewart, R.B., and Robinson, B.H., Phytofiltration of mercury-contaminated water: Volatilisation and plant-accumulation aspects, *Environmental and Experimental Botany*, 62, 78–85, 2008.
23. Yang, X.E., Long, X.X., Ye, H.B., He, Z.L., Calvert, D.V., and Stoffella, P.J., Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance), *Plant Soil*, 55, 181–189, 2004.
24. He, B., Yang, X.E., Ni, W.Z., and Wei, Y.Z., *Sedum alfredii*—a new lead-accumulating ecotype, *Acta Botanica Sinica*, 44, 1356–1370, 2002.
25. Xiong, J., He, Z., Liu, D., Mahmood, Q., and Yang, X., The role of bacteria in the heavy metals removal and growth of *Sedum alfredii* Hance in an aqueous medium, *Chemosphere*, 70, 489–494, 2008.
26. Liu, D., Li, T.Q., Jin, X.F., Yang, X.E., Islam, E., and Mahmood, Q., Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*, *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (2), 129–140, 2008.
27. Sahi, S.V., Bryant, N.L., Sharma, N.C., and Singh, S.R., Characterization of a lead hyperaccumulator shrub, *Sesbania drummondii*, *Environmental Science and Technology*, 36 (21), 4676–4680, 2002.
28. Israr, M., Sahi, S., Datta, R., and Sarkar, D., Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*, *Chemosphere*, 65 (4), 591–598, 2006.
29. Kleiman, I.D. and Cogliatti, D.H., Chromium removal from aqueous solutions by different plant species, *Environmental Technology*, 19 (11), 1127–1132, 1998.
30. Waranusantigul, P., Kruatrachue, M., Pokethitayook, P., and Auesukaree, C., Evaluation of Pb phyto-remediation potential in *Buddleja asiatica* and *B. paniculata*, *Water, Air, and Soil Pollution*, 193, 79–90, 2008.
31. Ghnaya, T., Nouairi, I., Slama, I., Messedi, D., Grignon, C., Abdelly, C., and Ghorbel, M.H., Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*, *Journal of Plant Physiology*, 162 (10), 1133–1140, 2005.
32. Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W.H., Cai, Y., and Kennelley, E.D., A fern that hyperaccumulates arsenic, *Nature*, 409, 579, 2001.
33. Tu, S., Ma, L.Q., Fayiga, A.O., and Zillioux, E.J., Phytoremediation of arsenic-contaminated groundwater by the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L., *International Journal of Phytoremediation*, 6 (1), 35–47, 2004.
34. Natarajan, S., Stamps, R.H., Saha, U.K., and Ma, L.Q., Phytofiltration of arsenic-contaminated groundwater using *Pteris Vittata* L.: Effect of plant density and nitrogen and phosphorus levels, *International Journal of Phytoremediation*, 10 (3), 222–235, 2008.
35. Elless, M.P., Poynton, C.Y., Willms, C.A., Doyle, M.P., Lopez, A.C., Sökkary, D.A., Ferguson, B.W., and Blaylock, M.J., Pilot-scale demonstration of phytofiltration for treatment of arsenic in New Mexico drinking water, *Water Research*, 39, 3863–3872, 2005.
36. Srivastava, J., Kayastha, S., Jamil, S., and Srivastava, V., Environmental perspectives of *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash., *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 413–417, 2008.
37. Environmental Protection Agency (EPA), *Manual, Constructed Wetlands Treatment of Municipal Wastewaters*, EPA/625/R-99/010. Available at <http://www.epa.gov/ORD/NRMRL>, 2000a.
38. Environmental Protection Agency (EPA), *A Handbook of Constructed Wetlands*. Available at <http://www.epa.gov/OWOW/wetlands/pdf/hand.pdf>, 2000b.
39. Kadlec, R., Knight, R., Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P., and Haberl, R., *Constructed Wetlands for Pollution Control. Processes, Performance, Design and Operation*, IWA Publishing, London, 2000.
40. United States Department of Agriculture (USDA), *Constructed Wetlands*. Available at <http://www.wsi.nrcs.usa.gov/products/W2Q/AWM/docs/NEH637Ch3Constructed>, 2002.

41. Rousscau, D.P.L., Vanrolleghem, P.A., and De Pauw, N., Model-based design of horizontal subsurface flow constructed treatment wetlands: A review. *Water Research*, 38, 1484–1493, 2004.
42. Wallace, S., *Feasibility, Design Criteria, and O&M Requirements for Small Scale Constructed Wetland Wastewater Treatment Systems*, IWA Publishing, London, 2006.
43. Kandasamy, J. and Vigneswaran, S., *Constructed Wetlands*, Nova Science Publishers, New York, 2008.
44. Vymazal, J. and Kropfelová, L., *Wastewater Treatment in CW with Horizontal Sub-surface Flow*, Springer, the Netherlands, 2008.
45. Vymazal, J., Removal of nutrients in various types of constructed wetlands, *Science of the Total Environment*, 380, 48–65, 2007.
46. Zhang, X., Liu, P., Yang, Y., and Chen, W., Phytoremediation of urban wastewater by model wetlands with ornamental hydrophytes, *Journal of Environmental Sciences*, 19, 902–909, 2007.
47. Greenway, M., The role of macrophytes in nutrient removal using constructed wetlands, in *Environmental Bioremediation Technologies*, Singh, S.N. and Tripathi, R.D., Eds, Springer, Berlin, Heidelberg, 2007, pp. 331–351.
48. Rai, P.K., Heavy metal pollution in aquatic ecosystems and its phytoremediation using wetland plants: An ecosustainable approach, *International Journal of Phytoremediation*, 10, 133–160, 2008a.
49. Miretzky, P., Saralegui, A., and Fernández Cirelli, A., Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere*, 57 (8), 997–1005, 2004.
50. Hurd, N.A. and Sternberg, S.P.K., Bioremoval of aqueous lead using *Lemna minor*. *International Journal of Phytoremediation*, 10 (4), 278–288, 2008.
51. Benaroya, R.O., Tzin, V., Tel-Or, E., and Zamski, E., Lead accumulation in the aquatic fern *Azolla filiculoides*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 639–645, 2004.
52. Wang, K.S., Huang, L.C., Lee, H.S., Chen, P.Y., and Chang, S.H., Phytoextraction of cadmium by *Ipomoea aquatica* (water spinach) in hydroponic solution: Effects of cadmium speciation, *Chemosphere*, 72 (4), 666–672, 2008.
53. Shukla, O.P., Dubey, S., and Rai, U.N., Preferential accumulation of cadmium and chromium: Toxicity in *Bacopa monnieri* L. under mixed metal treatments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 78, 252–257, 2007.
54. Olguín, E.J., Vidal, M., Sánchez-Galván, G., and Houbron, E., Bioadsorption and intracellular accumulation factors of lead in constructed wetlands microcosms with *Salvinia minima* operating continuously: The effect of light intensity. *International Symposium on Biotechnology*, Dalian, China, October 12–17, 2008.
55. Choo, T.P., Lee, C.K., Low, K.S., and Hishamuddin, O., Accumulation of chromium(VI) from aqueous solutions using water lilies (*Nymphaea spontanea*), *Chemosphere*, 62 (6), 961–967, 2006.
56. Schor-Fumbarov, T., Keilin, Z., and Tel-Or, E., Characterization of cadmium uptake by the water lily *Nymphaea aurora*, *International Journal of Phytoremediation*, 5 (2), 169–179, 2003.
57. Yongpisanphop, J., Kruatrachue, M., and Pokethitiyook, P., Toxicity and accumulation of lead and chromium in *Hydrocotyle umbellata*. *Journal of Environmental Biology*, 26 (1), 79–89, 2005.
58. Goulet, R.R., Lalonde, J.D., Munger, C., Dupuis, S., Dumont-Frenette, G., Prémont, S., and Campbell, P.G.C., Phytoremediation of effluents from aluminum smelters: A study of Al retention in mesocosms containing aquatic plants, *Water Research*, 39, 2291–2300, 2005.
59. Fritioff, A. and Greger, M., Aquatic and terrestrial plant species with potential to remove heavy metals from stormwater. *International Journal of Phytoremediation*, 5 (3), 211–224, 2003.
60. Eapen, S., Singh, S., and D'Souza, S.F., Phytoremediation of metals and radionuclides, in *Environmental Bioremediation Technologies*, Singh, S.N. and Tripathi, R.D., Eds, Springer, Berlin, Heidelberg, 2007, pp. 189–209.
61. Rai, P.K. and Tripathi, B.D., Comparative assessment of *Azolla pinnata* and *Vallisneria spiralis* in Hg removal from G.B. Pant Sagar of Singrauli Industrial region, India. *Environmental Monitoring Assessment*, 148, 75–84, 2009.
62. Bragato, C., Brix, H., and Malagoli, M., Accumulation of nutrients and heavy metals in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel and *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla in a constructed wetland of the Venice lagoon watershed. *Environmental Pollution*, 144, 967–975, 2006.
63. Choi, J.H., Park, S.S., and Jaffe, P.R., The effect of emergent macrophytes on the dynamics of sulfur species and trace metals in wetland sediments. *Environmental Pollution*, 140, 286–293, 2006.
64. Gruber, H., Wiessner, A., Kuschik, P., Kacstner, M., and Appenroth, K.J., Physiological responses of *Juncus effusus* (rush) to chromium and relevance for wastewater treatment in constructed wetlands. *International Journal of Phytoremediation*, 10 (2), 79–90, 2008.

65. Maine, M.A., Suñe, N., Hadad, H., Sánchez, G., and Bonetto, C., Influence of vegetation on the removal of heavy metals and nutrients in a constructed wetland, *Journal of Environmental Management*, 90 (1), 355–363, 2009.
66. Vymazal, J., Svehla, J., Kropfelová, L., and Chrastny, V., Trace metals in *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* growing in constructed and natural wetlands, *Science of the Total Environment*, 380 (1–3), 154–162, 2007.
67. Weis, J.S. and Weis, P., Metal uptake, transport and release by wetlands plants implication for phytoremediation and restoration, *Environment International*, 30 (5), 739–753, 2004.
68. Nyquist, J. and Greger, M., A field study of constructed wetlands for preventing and treating acid mine drainage, *Ecological Engineering*, 35 (5), 630–642, 2009.
69. Wu, J.S., Ho, T.C., Chien, H.C., Wu, Y.J., Lin, S.M., and Juang, R.H., Characterization of the high molecular weight Cd-binding complex in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) when exposed to Cd, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (14), 5806–5812, 2008.
70. John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., and Sharma, S., Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L., *Plant Soil and Environment*, 54 (6), 262–270, 2008.
71. Liao, S.W. and Chang, N.L., Heavy metal phytoremediation by water hyacinth at constructed wetlands in Taiwan, *Journal of Aquatic Plant Management*, 42, 60–68, 2004.
72. Olguín, E.J., Sánchez-Galván, G., Pérez-Pérez, T., and Pérez-Orozco, A., Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of lead in batch operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32, 577–586, 2005.
73. Bennicelli, R., Stezpniewska, Z., Banach, A., Szajnocha, K., and Ostrowski, J., The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal waste water, *Chemosphere*, 55, 141–146, 2004.
74. Rai, P.K., Phytoremediation of Hg and Cd from industrial effluents using an aquatic free floating macrophyte *Azolla Pinnata*, *International Journal of Phytoremediation*, 10, 430–439, 2008b.
75. Benaroya, R.O., Tzin, V., Tel-Or, E., and Zamski, E., Lead accumulation in the aquatic fern *Azolla filiculoides*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 639–645, 2004.
76. Olguín, E.J., Hernández, E., and Ramos, I., The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium, *Acta Biotechnologica*, 22, 121–131, 2002.
77. Sánchez-Galván, G., Monroy, O., Gómez, J., and Olguín, E.J., Assessment of the hyperaccumulating lead capacity of *Salvinia minima* using bioadsorption and intracellular accumulation factors, *Water, Air, and Soil Pollution*, 194, 77–90, 2008.
78. Phetsombat, S., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., and Upatham, S., Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in *Salvinia cucullata*, *Journal of Environmental Biology*, 27 (4), 645–652, 2006.
79. Al-Hamdani, S.H. and Blair, S.L., Influence of copper on selected physiological responses in *Salvinia minima* and its potential use in copper remediation, *American Fern Journal*, 94 (1), 47–56, 2004.
80. Upadhyay, A.R., Mishra, V.K., Pandey, S.K., and Tripathi, B.D., Biofiltration of secondary treated municipal wastewater in a tropical city, *Ecological Engineering*, 30, 9–15, 2007.
81. Mishra, V.K., Upadhyaya, A.R., Pandey, S.K., and Tripathi, B.D., Heavy metal pollution induced due to coal mining effluent on surrounding aquatic ecosystem and its management through naturally occurring aquatic macrophytes, *Bioresource Technology*, 99 (5), 930–936, 2008.
82. Upadhyay, A.R. and Tripathi, B.D., Principle and process of biofiltration of Cd, Cr, Co, Ni and Pb from tropical opencast coalmine effluent, *Water, Air, and Soil Pollution*, 180, 213–223, 2007.
83. Jayaweera, M.W., Kasturiarachchia, J.C., Kularatnea, R.K.A., and Wijeyekoon, S.L.J., Contribution of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) grown under different nutrient conditions to Fe-removal mechanisms in constructed wetlands, *Journal of Environmental Management*, 87 (3), 450–460, 2008.
84. Nahlik, A.M. and Mitsch, W.J., Tropical treatment wetlands dominated by free-floating macrophytes for water quality improvement in Costa Rica, *Ecological Engineering*, 28, 246–257, 2006.
85. Maine, M.A., Suñe, N., Hadad, H., Sánchez, G., and Bonetto, C., Nutrient and metal removal in a constructed wetland for wastewater treatment from a metallurgic industry, *Ecological Engineering*, 26, 341–347, 2006.
86. Azaizeh, H., Salhanj, N., Sebesvari, Z., Shardendu, S., and Emons, H., Phytoremediation of selenium using subsurface-flow constructed wetland, *International Journal of Phytoremediation*, 8 (3), 187–198, 2006.

87. Stein, O.R., Borden-Stewart, D.J., Hook, P.B., and Jones, W.L., Seasonal influence on sulfate reduction and zinc sequestration in subsurface treatment wetlands. *Water Research*, 41 (15), 3440–3448, 2007.
88. Singhakant, C., Koottatep, T., and Satayavivad, J., Enhance arsenic removals through plant interactions in subsurface-flow constructed wetlands, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 44 (2), 163–169, 2009.
89. Lesage, E., Rousseau, D.P.L., Meers, E., Van de Moortel, A.M.K., Du Laing, G., Tack, F.M.G., De Pauw, N., and Verloo, M.G., Accumulation of metals in the sediment and reed biomass of a combined constructed wetland treating domestic wastewater, *Water, Air, and Soil Pollution*, 183, 253–264, 2007.
90. Gardea-Torresdey, J.L., de la Rosa, G., and Peralta-Videa, J.R., Use of phytofiltration technologies in the removal of heavy metals: A review, *Pure and Applied Chemistry*, 76 (4), 801–813, 2004.
91. Gavrilescu, M., Removal of heavy metals from the environment by biosorption, *Engineering Life Sciences*, 4 (3), 219–232, 2004.
92. Das, N., Vimala, R., and Karthika, P., Biosorption of heavy metals—an overview. *Indian Journal of Biotechnology*, 7 (2), 159–169, 2008.
93. Gadd, G.M., Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84 (1), 13–28, 2009.
94. Ahluwalia, S.S. and Goyal, D., Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater, *Bioresource Technology*, 98 (12), 2243–2257, 2007.
95. Mohan, D. and Pittman, C.U., Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents—a critical review, *Journal of Hazardous Materials*, 142 (1–2), 1–53, 2007.
96. Ngah, W.S.W. and Hanafiah, M.A.K.M., Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: A review, *Bioresource Technology*, 99, 3935–3948, 2008.
97. Sud, D., Mahajan, G., and Kaur, M.P., Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions—a review, *Bioresource Technology*, 99 (14), 6017–6027, 2008.
98. Vijayaraghavan, K. and Yun, Y.S., Bacterial biosorbents and biosorption, *Biotechnology Advances*, 26 (3), 266–291, 2008.
99. Freitas, O.M.M., Martins, R.J.E., Delerue-Matos, C.C., and Boaventura, R.A.R., Removal of Cd(II), Zn(II) and Pb(II) from aqueous solutions by brown marine macro algae: Kinetic modeling, *Journal of Hazardous Materials*, 153, 493–501, 2008.
100. Gupta, V.K. and Rastogi, A., Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: Kinetics and equilibrium studies, *Journal of Hazardous Materials*, 152, 407–414, 2008.
101. Rakhshae, R., Giahi, M., and Pourahmad, A., Studying effect of cell wall's carboxyl-carboxylate ratio change of *Lemna minor* to remove heavy metals from aqueous solution, *Journal of Hazardous Materials*, 163 (1), 165–173, 2009.
102. Sawalha, M.F., Peralta-Videa, J.R., Saupe, G.B., Dokken, K.M., and Gardea-Torresdey, J.L., Using FTIR to corroborate the identity of functional groups involved in the binding of Cd and Cr to saltbush (*Atriplex canescens*) biomass, *Chemosphere*, 66 (8), 1424–1430, 2007.
103. Basha, S., Murthy, Z.V.P., and Jha, B., Biosorption of hexavalent chromium by chemically modified seaweed, *Cystoseira indica*, *Chemical Engineering Journal*, 137 (3), 480–488, 2008.
104. Ho, Y.S., Chiu, W.T., Hsu, C.S., and Huang, C.T., Sorption of lead ions from aqueous solution using tree fern as a sorbent, *Hydrometallurgy*, 73, 55–61, 2004.
105. Mukherjee, S. and Kumar, S., Adsorptive uptake of arsenic(V) from water by aquatic fern *Salvinia natans*, *Journal of Water Supply Research and Technology—Aqua*, 54 (1), 47–53, 2005.
106. Baral, S.S., Das, S.N., Chaudhury, G.R., and Rath, P., Adsorption of Cr(VI) by treated weed *Salvinia cucullata*: Kinetics and mechanism, *Adsorption*, 14, 111–121, 2008a.
107. Baral, S.S., Das, S.N., Roy Chaudhury, G., Swamy, Y.V., and Rath, P., Adsorption of Cr(VI) using thermally activated weed *Salvinia cucullata*, *Chemical Engineering Journal*, 139, 245–255, 2008b.
108. Rakhshae, R., Khosravi, M., and Ganji, M.T., Kinetic modeling and thermodynamic study to remove Pb(II), Cd(II), Ni(II) and Zn(II) from aqueous solution using dead and living *Azolla filiculoides*, *Journal of Hazardous Materials*, B134, 120–129, 2006.
109. Lloyd-Jones, P.J., Rangel-Mendez, J.R., and Streat, M., Mercury sorption from aqueous solution by chelating ion exchange resins, activated carbon and a biosorbent, *Process Safety and Environmental Protection*, 82 (4), 301–311, 2004.
110. Gude, S.M. and Das, S.N., Adsorption of chromium(VI) from aqueous solutions by chemically treated water hyacinth *Eichhornia crassipes*, *Indian Journal of Chemical Technology*, 15 (1), 12–18, 2008.

111. Mohanty, K., Jha, M., Meikap, B.C., and Biswas, M.N., Biosorption of Cr(VI) from aqueous solutions by *Eichhornia crassipes*. *Chemical Engineering Journal*, 117 (1), 71–77, 2006.
112. Miretzky, P., Saralegui, A., and Fernández-Cirelli, P., Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes, *Chemosphere*, 62, 247–254, 2006.
113. Saygideger, S., Gulnaz, O., Istifi, E.S., and Yucel, N., Adsorption of Cd(II), Cu(II) and Ni(II) ions by *Lemna minor* L.: Effect of physicochemical environment. *Journal of Hazardous Materials*, 126 (1–3), 96–104, 2005.
114. Verma, V.K., Tewari, S., and Rai, J.P.N., Ion exchange during heavy metal bio-sorption from aqueous solution by dried biomass of macrophytes, *Bioresource Technology*, 99 (6), 1932–1938, 2008.
115. Yang, C.Z., Wang, S.R., Zeng, A.Y., Jin, X.C., Xu, Q.J., and Zhao, J.Z., Equilibrium and kinetics of copper(II) biosorption by *Myriophyllum spicatum* L., *Journal of Environmental Sciences (China)*, 17 (6), 1025–1029, 2005.
116. Bunluesin, S., Kruatrachue, M., Pokethitayook, P., Upatham, S., and Lanza, G.R., Batch and continuous packed column studies of cadmium biosorption by *Hydrilla verticillata* Biomass, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103 (6), 509–513, 2007.
117. Lacher, C. and Smith, R.W., Sorption of Hg(II) by *Potamogeton natans* dead biomass, *Minerals Engineering*, 15 (3), 187–191, 2002.
118. Elangovan, R., Philip, L., and Chandraraj, K., Biosorption of chromium species by aquatic weeds: Kinetics and mechanism studies, *Journal of Hazardous Materials*, 152 (1), 100–112, 2008.
119. Uluozlu, O.D., Saria, A., Tuzcna, M., and Soylak, M., Biosorption of Pb(II) and Cr(III) from aqueous solution by lichen (*Parmelina tiliaceae*) biomass, *Bioresource Technology*, 99 (8), 2972–2980, 2008.
120. Sari, A., Tuze, M., Uluozlu, O.D., and Soylak, M., Biosorption of Pb(II) and Ni(II) from aqueous solution by lichen (*Cladonia furcata*) biomass, *Biochemical Engineering Journal*, 37 (2), 151–158, 2007.
121. Chojnacka, K., Biosorption and bioaccumulation of microelements by *Riccia fluitans* in single and multi-metal system, *Bioresource Technology*, 98 (15), 2919–2925, 2007.
122. Badr, N.B.E. and Fawzy, M., Bioaccumulation and biosorption of heavy metals and phosphorous by *Potamogeton pectinatus* L. and *Ceratophyllum demersum* L. in two Nile Delta lakes, *Fresenius Environmental Bulletin*, 17 (3), 282–292, 2008.
123. Lesage, E., Mundia, C., Rousseau, D.P.L., Van de Moortela, A.M.K., Du Laing, G., Meersa, E., Tackx, F.M.G., De Pauw, N., and Verloo, M.G., Sorption of Co, Cu, Ni and Zn from industrial effluents by the submerged aquatic macrophyte *Myriophyllum spicatum* L., *Ecological Engineering*, 30, 320–325, 2007.
124. Keskinan, O., Goksu, M.Z.L., Yuceer, A., and Basibuyuk, M., Comparison of the adsorption capabilities of *Myriophyllum spicatum* and *Ceratophyllum demersum* for zinc, copper and lead, *Engineering Life Sciences*, 7 (2), 192–196, 2007.