



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICO-QUÍMICAS Y
NATURALES

Tesis de Maestría en Biotecnología, Orientación Microbiana y Vegetal.

**PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DEL MECANISMO DE
REMEDIACIÓN/METABOLISMO DE FENOL POR UNA MACRÓFITA
ACUÁTICA *Lemna minuta* Kunth**

Ingeniera Agrónoma Laura Herrera

DIRECTORA: Dra. Melina Talano

CODIRECTORA: Dra. Paola González

Río Cuarto, Diciembre 2019

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

JURADO

Firma Aclaración

Firma Aclaración

Firma Aclaración

Agradecimientos

A mis directoras de tesis, Melina y Paola, por su dedicación genuina, por sus constantes aportes y porque fueron muy importantes en este que ha sido un largo camino, a ellas que me brindaron muchas palabras de aliento y apoyo para que no abandone este proyecto y pueda terminar esta etapa tan importante para mí.

A mis padres, por estar siempre presentes y apoyarme en cada decisión tomada, porque son incondicionales. Por ayudarme a desempeñarme tanto en el ámbito personal como laboral con valores inculcados en casa y por la educación que me brindaron a lo largo de la vida; todos ellos puntapié, que hoy me permiten estar culminando una de mis metas.

A César, por la paciencia brindada durante todo este tiempo, por la confianza de cada día para poder seguir adelante, por ser mi confidente y pilar de vida tan fundamental.

A mi Juanma, por ser el mejor bebé que Dios eligió para que fuera su mamá, por enseñarme a ser mejor persona cada día, por esa sonrisa, paz e inocencia que alientan para tomar impulso cada vez más.

A mis amigas de la vida, Marilín y Nadia por siempre acompañarme en todo, con quienes puedo ser simplemente yo, con errores y defectos, por ser mis confidentes y aguantarme durante tantos años de amistad.

A todas las personas del laboratorio, que me recibieron de la mejor manera, que supieron ser solidarios conmigo para poder llevar a cabo los procedimientos experimentales y siempre con buena predisposición. Principalmente a Cintia, por ofrecerme un espacio en este lugar.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitir formarme académicamente y brindarme educación de excelencia. Porque aquí es donde elegí realizar mi carrera de grado y hoy puedo estar terminando mi carrera de posgrado.

A todos, ¡Muchas gracias!

Resumen

La contaminación de la biósfera ha tenido en los últimos años un crecimiento exponencial, ocasionando daños para la salud humana y numerosos problemas ambientales. En este sentido, contaminantes orgánicos como los fenoles y sus derivados son de gran relevancia, dada su alta toxicidad y persistencia cuando son liberados al medio ambiente. La forma en la que ingresan en el ambiente se debe principalmente a diversas actividades industriales, entre ellas la industria de curtido de cueros. En la actualidad, se plantean diferentes tecnologías alternativas consideradas inocuas y amigables para el saneamiento ambiental, entre ellas, la fitorremediación. Dentro de la fitorremediación, el uso de plantas acuáticas es de gran interés por su alta productividad de biomasa, su capacidad de adsorber o incorporar contaminantes a través de la raíz o la parte aérea y por su fácil adaptación a diferentes condiciones ambientales.

El presente trabajo tuvo como objetivo el estudio de la fitorremediación de fenol de soluciones sintéticas y de materia orgánica de efluentes de curtiembre, utilizando una macrófita acuática (*Lemna minuta* Kunth) mediante la evaluación de mecanismos bioquímicos.

Los resultados demostraron que la remoción de fenol (100 y 200 mg/L) fue total a los 5 días de tratamiento, sin observarse efectos tóxicos del fenol sobre las plantas de *L. minuta* Kunth. La biomasa fue reutilizada para la remoción de fenoles durante 8 ciclos consecutivos, en donde se observó que las plantas fueron capaces de remover el 100% de fenol y lograron aún aumentar su biomasa.

Cuando se analizaron los posibles mecanismos involucrados en la remoción, se detectó actividad peroxidasa, cuyos valores fueron similares a las plantas control cuando la remoción de fenoles fue completa (5 días) para ambas concentraciones analizadas. La tinción con fluoroglucinol-HCl (F-HCl), utilizada para evaluar *in situ* los cambios en el patrón de lignosuberización en plantas enteras expuestas a fenol, permitió poner en evidencia polímeros tipo lignina y suberina con una característica coloración rojiza en hojas de plantas tratadas con el contaminante.

Cuando se analizó la capacidad de *L. minuta* Kunth para remover materia orgánica de un efluente real de curtiembre, los resultados demostraron que esta planta fue capaz de lograr una eficiencia de remoción de fenol del 53% al ajustarse previamente el pH del efluente a un valor de 7; mientras que la eficiencia de remoción fue del 74% cuando el efluente fue diluido a la mitad.

Los resultados obtenidos indican que el uso de *L. minuta* Kunth podría ser efectiva para ser aplicada en el tratamiento de aguas contaminadas, sugiriendo que el fenol no sería tóxico bajo las concentraciones estudiadas, siendo quizás metabolizado por las plantas como fuente de carbono y energía. Además, la producción de peroxidasas y la formación de polímeros tipo lignina, que serían compartimentalizados con componentes de la pared celular, son características con gran potencial para el desarrollo de un sistema de fitorremediación sostenible en el tiempo. Finalmente, se destaca la tolerancia de las plantas y la capacidad para remover materia orgánica a partir de un efluente de curtiembre, características que permiten proponer a esta especie en programas de fitorremediación.

Abstract

In recent years, biosphere pollution has been growing, which has resulted in a lot of environmental problems and human health damage. In this sense, the study of organic pollutants such as phenol and its derivatives have great importance, given their toxicity and persistence when they are released into the environment. Mainly these compounds are emitted to the environment by industries such as tanneries. Nowadays, among the remediation technologies considered safe and environmentally friendly can be mentioned the phytoremediation. Regarding these, aquatic plants are of great interest because of their high biomass productivity, absorption capability through roots or aerial parts, and their easy adaptability to different environmental conditions.

The aim of this work was to evaluate phenolic compound removal from synthetic solutions, and from tannery effluents, using an aquatic macrophyte (*Lemna minuta* Kunth) through the study of the biochemical.

Phenol removal was evaluated at different times, being completely removed after 5 days for both concentrations (100 y 200 mg/L) without toxic effects on *L. minuta* Kunth plants. Moreover, it is important to note that 100% of phenol was removed when plant biomass was reused during a period of 8 consecutive cycles, being also increased the biomass.

The potential mechanisms involved in the removal of phenol showed peroxidase activity, recovering the values of the control when the phenol removal was complete (after 5 days) for both analyzed concentrations. The fluoroglucinol-HCl (F-HCl) staining technique was used to evaluate *in situ* changes in the ligno-suberization pattern in plants exposed to phenol showing that lignin and suberine polymers with a characteristic reddish color on leaves of plants treated with phenol.

The assessment of *L. minuta* Kunth to remove organic matter showed that this macrophyte was able to remove phenolic compounds in 53%, being the pH previously adjusted to 7, and 74% when the effluent was half diluted. For both strategies, the most removal ability was attributed to the presence of its own native microbial community.

These findings demonstrated that the use of *L. minuta* Kunth in phytoremediation programs might be an effective economic and ecological strategy to be applied in contaminated water, suggesting that phenol would not be toxic for the plant under the studied concentrations and it would be metabolized. Moreover, our results suggest that phenol could be used as a source of carbon and energy through their degradation pathway. In addition, the production of peroxidases and polymers such as lignin, which could be compartmentalized in the cell wall, are characteristics with great potential for the use of this species in phytoremediation programs. Finally, the tolerance of the plants and their ability to remove organic matter from a tannery effluent was highlighted, resulting in a promising strategy to be considered for phytoremediation systems.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Contaminación ambiental	1
1.2. Contaminación por compuestos fenólicos	3
1.2.1. Compuestos fenólicos: toxicidad.....	5
1.3. Tecnologías para la remediación de contaminantes.....	7
1.3.1. La fitorremediación como una herramienta de remediación ambiental	8
1.3.2. Fitorremediación mediante la utilización de plantas acuáticas	9
1.3.2.1. Características y aplicación de plantas acuáticas del género <i>Lemna</i> en fitorremediación.....	10
1.3.3. Mecanismos de remoción de compuestos fenólicos en plantas.....	13
1.3.3.1. Rol de las peroxidasas en la remoción de fenoles	16
1.3.4. Fitorremediación de efluentes industriales utilizando macrófitas acuáticas/especies del género <i>Lemna</i>	19
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	21
2.1. HIPÓTESIS.....	21
2.2. Objetivo General.....	21
2.3. Objetivos Específicos.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Material Vegetal.....	22
3.2. Ensayos de remoción de fenol	22
3.3. Ensayos de reutilización de plantas para ensayos consecutivos de remoción	23
3.4. Ensayos de remoción con agregado de H ₂ O ₂	23
3.5. Determinación colorimétrica de fenol	24
3.6. Participación de peroxidasas en el proceso de remoción de fenol.....	24
3.6.1. Evaluación de actividad peroxidasa y de perfiles electroforéticos de plantas control y tratadas con fenol	24
3.6.1.1. Obtención de extracto crudo vegetal	25
3.6.1.2. Determinación espectrofotométrica de actividad peroxidasa.....	25
3.6.1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida catiónica y aniónica	25
3.6.2. Estudios macroscópicos y estructurales de plantas expuestas a fenol.....	26
3.6.2.1. Observación macroscópica de plantas expuestas a fenol: Tinción de lignina y suberina.....	26

3.6.2.2. Estudios estructurales en raíz: Inclusión en parafina, cortes y observación	26
3.7. Caracterización de efluentes de curtiembre y remediación de materia orgánica empleando <i>L. minuta</i> Kunth.....	27
3.7.1. Determinación de parámetros físico-químicos del efluente	27
3.7.2. Remediación de materia orgánica del efluente.....	28
3.8. Análisis estadístico.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Remoción de fenol por plantas de <i>L. minuta</i> Kunth y efecto del contaminante sobre la biomasa.....	29
4.1.1. Remoción de fenol a distintos tiempos.....	29
4.1.2. Ensayos de reutilización de plantas para ensayos consecutivos de remoción de fenol.....	32
4.1.3. Efecto del agregado de H ₂ O ₂ exógeno sobre la remoción de fenol.....	35
4.2. Participación de peroxidasas vegetales en el proceso de remoción de fenol.....	36
4.2.1. Cuantificación de la actividad peroxidasa en los tejidos a distintos tiempos durante el proceso de remoción.....	36
4.2.2. Análisis de los perfiles de isoenzimas de peroxidasas	39
4.2.3. Análisis morfológico de raíces y parte aérea de <i>L. minuta</i> Kunth tratadas con fenol.....	41
4.2.3.1. Análisis macroscópico de raíces y parte aérea bajo tinciones específicas	41
4.2.3.2. Análisis estructural de raíces	42
4.3. Evaluación del potencial de <i>L. minuta</i> Kunth para la remediación de materia orgánica de efluentes de curtiembre	44
4.3.1. Caracterización físico-química del efluente	44
4.3.2. Remediación de materia orgánica del efluente.....	45
5. CONCLUSIONES	50
5.1. Conclusiones Parciales.....	50
5.2. Conclusión final.....	51
Bibliografía.....	52
ANEXO	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de fenol	6
Figura 2. Géneros de la familia <i>Araceae</i>	11
Figura 3. Comparación de individuos de Géneros de la familia <i>Araceae</i>	11
Figura 4. Especies del género <i>Lemna</i>	12
Figura 5. Plantas de <i>L. minuta</i> Kunth y su morfología bajo observación con lupa (10X).	13
Figura 6. Representación esquemática de los mecanismos involucrados en la transformación de compuestos fenólicos.....	15
Figura 7. Radicales libres intermediarios generados a partir de un monolignol natural (alcohol coniferílico) por oxidación de su fenol por peroxidasas y/o lacasas	17
Figura 8. Ciclo catalítico de las peroxidasas	18
Figura 9. Vías de degradación de fenol en bacterias.....	19
Figura 10. Eficiencia de remoción de fenol por <i>L. minuta</i> Kunth a diferentes tiempos (3 y 6 h) y días (2 y 5 días).....	29
Figura 11. Efecto del contaminante sobre la producción de biomasa a los 5 días de ensayo	31
Figura 12. Ciclos de remoción de fenol y peso fresco de las plantas	32
Figura 13. Fenol residual de ensayos durante 48 horas con agregado de H ₂ O ₂ exógeno en la mezcla de remoción	36
Figura 14. Medida de actividad peroxidasa en parte aérea y en raíz de <i>L. minuta</i> Kunth.....	37
Figura 15. Actividad peroxidasa en plantas de <i>L. minuta</i> Kunth en condiciones control y expuestas a fenol (100 y 200 mg/L), luego de 2 y 5 días de tratamiento	38
Figura 16. Perfiles de isoenzimas de peroxidasas ácidas y básicas en plantas enteras de <i>Lemna minuta</i> Kunth	39
Figura 17. Imágenes obtenidas con lupa (10X) de órganos vegetales teñidos con F-HCl. Raíces transformadas de tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) usado como control (A), parte aérea de <i>L. minuta</i> Kunth control (B), tratadas con 100 mg/L de fenol (C y D) y tratadas con 200 mg/L de fenol (E y F).....	42
Figura 18. Cortes transversales de tejido de raíz incluido en parafina de plantas de <i>L. minuta</i> Kunth en condiciones control (A) y tratadas con 100 mg/L de fenol (B) y 200 mg/L de fenol (C) observadas en microscopio con aumento 40X	43
Figura 19. Crecimiento de <i>L. minuta</i> Kunth en efluentes de curtiembre	46
Figura 20. Valores de DQO de efluente de curtiembre y eficiencia de remoción de materia orgánica empleando plantas de <i>L. minuta</i> Kunth	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de compuestos fenólicos en distintas actividades industriales.....	4
Tabla 2. Ventajas y desventajas de la fitorremediación	9
Tabla 3. Parámetros físico-químicos del efluente.....	45

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
µL	Microlitro
µmol m ⁻² s ⁻¹	Micromol por metro cuadrado por segundo
2,4-DCP	2,4-Diclorofenol
2,4,5-TCP	2,4,5-Triclorofenol
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APG	Angiosperm Phylogeny Group
APX	Ascorbato peroxidasa
ATSDR	Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades
CMN	Comunidad microbiana nativa
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DQO	Demanda Química de Oxígeno
Efl	Efluente
FAA	Formaldehído, alcohol, acético
Fastgreen FCF	Colorante sintético color verde
F-HCl	Fluoroglucinol-HCl
g	Gramos
h	Horas
HAc	Ácido acético
K _{ow}	Coefficiente de partición octanol/agua
M	Molar
mg	Miligramos
mg/L	Miligramos por Litro
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaAc	Acetato de sodio
nm	Nanómetro
<i>o</i> -D	<i>orto</i> -dianisidina
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCB	Bifenilos policlorados
PF	Peso fresco
pH	Potencial de hidrógeno
P/V	Relación Peso/Volumen
RH	Equivalente redactor
Rf	Movilidad electroforética relativa
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Detergente dodecilsulfato sódico
SDT	Sólidos Disueltos Totales
STS	Sólidos Totales en Suspensión
UI	Unidad Internacional de Actividad Enzimática
US EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminación ambiental

La contaminación del medioambiente es actualmente foco de atención a nivel mundial. La misma se define como la presencia en el ambiente de cualquier agente que pueda dañar el medio, la vida vegetal, animal o la salud humana, poniendo en riesgo la seguridad o bienestar de la población. Incluye no sólo componentes químicos, sino también organismos, materiales biológicos, agentes físicos y diversos tipos de energía (por ejemplo; radiación, calor, etc.) o bien una combinación de varios de ellos (Briggs, 2003). El ingreso de contaminantes en la naturaleza es principalmente el resultado de actividades antropogénicas, pero también se puede producir de manera natural (Delgadillo-López y col., 2011). Los contaminantes se pueden dividir en dos tipos (Daly y Zannetti, 2007):

- Contaminantes primarios: aquellos que ejercen daño en la forma en la que ingresan al ambiente.
- Contaminantes secundarios: aquellos contaminantes que son sintetizados como resultado de un proceso químico y que frecuentemente provienen de precursores que son menos dañinos.

Así mismo, la contaminación puede clasificarse de diversas formas, de acuerdo con la fuente de la cual provienen, el medio afectado o la naturaleza del contaminante. Acorde a este último, se clasifican según Delgadillo-López y col. (2011 y citas de la revisión), de manera general en:

- Contaminantes inorgánicos:
 - Metales pesados (Cd, Hg, Pb y Cr) y otros elementos metaloides (As y B).
 - Radionucleidos como ^{60}Co y ^{137}Cs .
 - Elementos traza esenciales para la nutrición y crecimiento de plantas (B, Cu, Fe, Mn, Mo y Zn) y animales (As, Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Zn, Cr, F, Ni, Se, Sn y V) que en concentraciones elevadas resultan nocivos.
 - Metales “no esenciales” (Cd, Hg, Pb, Ag, U) que son tóxicos incluso en bajas concentraciones.

La toxicidad de estos elementos depende de la forma química en la que se encuentren, su concentración y persistencia en el medio.

- Contaminantes orgánicos: son aquellos que incluyen los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), bifenilos policlorados (PCB), dioxinas, hidrocarburos de petróleo, disolventes clorados, compuestos aromáticos que se emplean en la producción de colorantes, explosivos, productos farmacéuticos, plaguicidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas), surfactantes, entre otros. Son menos tóxicos para las plantas que los contaminantes inorgánicos por ser menos reactivos y acumularse en menor proporción (Cherian y Oliveira, 2005).

Según el medio afectado, existen diferentes tipos de contaminación, entre ellas la contaminación del aire, suelo y agua. Los contaminantes del aire pueden ser emitidos en la atmósfera por fuentes de origen natural o debido a actividades humanas, o bien, se pueden formar en la atmósfera por las interacciones químicas entre contaminantes primarios y las condiciones o constituyentes atmosféricos. La contaminación del suelo puede ser en muchos casos producida por la expansión de ciertas técnicas de industrialización. Así, zonas rurales agrícolas pueden presentar destrucción de la capa vegetal por el uso de malas técnicas de cultivo, la frecuencia de incendios forestales, el mantenimiento permanente de ganado en los pastizales, etc. Además, el suelo puede contaminarse por derrame de aguas residuales industriales, o el vertido de efluentes sin tratar, lo que ha aumentado considerablemente en las últimas décadas (Bagad, 2009). Por último, la contaminación del agua se considera como la adición a la misma de materiales que deterioran su calidad, puede ser materia inerte como compuestos inorgánicos, compuestos orgánicos o materia viva como la de microorganismos, producto de la contaminación que ocurre no sólo de manera natural, sino también debido a actividades que involucran la actividad humana como la urbanización, avances tecnológicos, prácticas culturales no seguras y la rápida industrialización (Solís y López, 2003). El agua puede contaminarse naturalmente por algunas sustancias o por elementos libres como Na, K, Cu, Fe, Ca y Se. En cambio, las sustancias introducidas por las actividades humanas pueden incluir sales, residuos de hidrocarburos derivados del petróleo, solventes provenientes de la industria y la agricultura, así como lixiviados de depósitos de basura, letrinas y pozos negros (Abarca y Brenes, 2007). Los contaminantes más importantes en las corrientes de agua son aquellos derivados de los efluentes descargados de plantas industriales. En la mayoría de los casos, las aguas residuales de éstas se descargan directamente sin ningún tipo de tratamiento. En cuanto a su composición y cantidad de contaminantes son muy variables debido a las diferentes tecnologías utilizadas. Las aguas residuales pueden también presentar patógenos (bacterias, virus y protozoos), helmintos (gusanos del intestino), nutrientes (nitrógeno y

fósforo), sólidos (incluyendo materia orgánica), aceites y grasas, metales pesados (Hg, Cd, Pb, Cr, Cu), y muchos químicos tóxicos como PAH, pesticidas, fenoles y compuestos clorados (Tiwari y col., 2017).

En la provincia de Córdoba, se han detectado varios sitios en estado crítico por contaminación del aire, suelos y cuerpos de agua (Gomez y Martínez, 2010; Merlo y col., 2011; Bazán y col., 2017, 2019). Además, existen evidencias que indican que algunos de los grandes ríos y lagos, e incluso napas subterráneas están contaminados debido a la liberación no controlada de residuos domiciliarios, efluentes cloacales, residuos de la actividad industrial o minera, entre otros. Muchos de los efluentes poseen altos niveles de metales pesados, los cuales a menudo se combinan con contaminantes orgánicos aromáticos como los fenoles, aumentando así su toxicidad (Ontañón y col., 2015).

1.2. Contaminación por compuestos fenólicos

La contaminación por fenoles y/o compuestos relacionados procede de una gran variedad de industrias, por lo tanto, es común encontrarlos en efluentes provenientes de hornos de coque, refinerías de petróleo, fabricación de resinas fenólicas, herbicidas y fibra de vidrio. También pueden provenir de la industria farmacéutica, ya que los fenoles son usados en la producción de desinfectantes y antisépticos (Basha y col., 2010; Tiwari y col., 2017).

Debido a los grandes niveles de producción y a su inadecuada manipulación, los compuestos fenólicos se han detectado en concentraciones que oscilan entre 0,1 a 10.295 mg/L en las aguas residuales de diferentes industrias (Busca y col., 2008; Barco-Bonilla y col., 2013; Hamad y Ahmed, 2013, Faouzi y col., 2013). En la Tabla 1 se muestran las concentraciones de compuestos fenólicos en los efluentes generados en distintas operaciones industriales.

Existe una diversidad de reglamentaciones en varias naciones, que regulan los límites permitidos de fenoles en los efluentes industriales. Particularmente, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) determina que el nivel de fenol en agua no debe exceder los 3,5 mg/L (US EPA, 1989). Mientras que, en Argentina, la legislación vigente (Ley 24.051 de Residuos Peligrosos) establece un nivel guía de fenoles y/o fenoles totales de 1-2 µg/L para agua dulce superficial y agua de consumo humano (www.cecopal.org). Sin embargo, en diferentes regiones de Argentina se han detectado

zonas donde las concentraciones de estos contaminantes son superiores a lo determinado por la legislación vigente.

Las concentraciones frecuentemente encontradas en lagos y ríos, como consecuencia de desechos agrícolas o descargas de desechos industriales exceden ampliamente estas concentraciones, alcanzando en muchos casos hasta 1.000 mg/L (Tiwari y col., 2017).

Tabla 1. Concentraciones de compuestos fenólicos generados en distintas actividades industriales

Industria	Concentración de fenoles (mg/L)
Industrias del coque	28-3.900
Industrias del carbón	9-8.000
Petroquímicas	2,8-1.220
Pulpa y papel	0,1-1.600
Producción de gas	4.000
Refinerías	6-500
Farmacéutica	1.000
Fabricación de benceno	50
Manufactura de resinas	800-2.000
Curtiembres	500-10.295

Extraído y resumido de Tiwari y col., (2017), y Faouzi y col., (2013).

En particular, en la provincia de Córdoba se han registrado altos niveles de estos contaminantes como consecuencia de actividades agropecuarias y principalmente por actividades industriales (como las curtiembres, industrias químicas y petroquímicas), que vierten efluentes a los cauces naturales de agua. En un estudio preliminar efectuado en nuestro laboratorio, se detectaron elevados niveles de fenoles totales (hasta 17,5 mg/L) en efluentes provenientes de una curtiembre localizada en Elena, los cuales desembocan en el arroyo El Barreal (Paisio y col., 2012; Paisio y col., 2013).

Como es bien conocido, en las curtiembres se lleva a cabo el proceso de curtido, que implica un tratamiento químico mediante el cual se logra reforzar la estructura proteica de las pieles de animales convirtiéndolas en cuero. En este tratamiento químico intervienen los compuestos fenólicos que logran intercalarse entre las fibras del cuero, inhibiendo el

proceso de putrefacción. Estas industrias generan efluentes malolientes, altamente turbios y coloreados con alta concentración de sulfuro, cromo, compuestos orgánicos, fenoles, grandes cantidades de residuos sólidos suspendidos como pelos y otros restos de animales. Se estima que por cada kilogramo de cueros procesados se generan 30 litros de efluente, por lo que los volúmenes de efluentes producidos son muy abundantes. Además, presentan una particularidad ya que, debido a la alta carga orgánica, crean condiciones anaeróbicas de biodegradación, ocasionado por el elevado consumo de oxígeno disuelto por microorganismos y/o protozoos (Dargo y Ayalew, 2014).

1.2.1. Compuestos fenólicos: toxicidad

Los compuestos fenólicos incluyen un grupo de sustancias aromáticas que se caracterizan por presentar uno o más grupos hidroxilos unidos a un anillo de benceno, denominando a esta estructura química como fenol. Estos compuestos pueden ser obtenidos del alquitrán de hulla, pero mayormente son producidos sintéticamente por el hombre ya que no se encuentran en la naturaleza, por lo cual se los conoce como xenobióticos, a excepción de unos pocos como la lignina y otros fenoles presentes en plantas (Paisio y col., 2013; Tiwari y col., 2017). Se estima que, del total de compuestos fenólicos, aproximadamente el 4% son producidos naturalmente y el 96% restante son de origen sintético (Fernández, 2014).

En especial, el fenol recibe otros nombres como hidroxibenceno, oxibenceno, bencenol, hidrato fenílico, entre otros; su fórmula molecular es C_6H_6O (Figura 1). A temperatura ambiente, el fenol es un polvo blanco, cristalino, translúcido e incoloro. Los cristales son higroscópicos y se tornan de color rosa a rojo en el aire. Posee un olor característico, a alquitrán dulce y es soluble en alcohol, glicerol, acetona, petróleo y agua en menor medida (Basha y col., 2010).

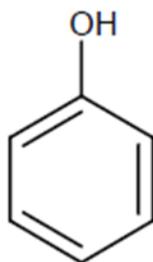


Figura 1. Estructura química de fenol

La propiedad química más notable del fenol es que en su forma ionizada es muy sensible a reacciones de sustitución electrofílica y a oxidaciones, debido a que es un ácido débil y presenta elevada reactividad del anillo, lo que posibilita la formación a partir de él, de gran cantidad de compuestos tales como fenoles di y trihídricos, ácidos hidrobenczoicos, nitrofenoles, clorofenoles, aminofenoles, metoxifenoles, fenoxifenoles, alquilfenoles, derivados de núcleos aromáticos condensados (naftoles) y algunos productos resultantes de la degradación de los plaguicidas (Tiwari y col., 2017). Las propiedades de cada uno de estos compuestos químicos dependen de la naturaleza de los grupos sustituidos en el anillo bencénico (Michałowicz y Duda, 2007).

Dadas estas características, según la US EPA (www.epa.gov) y la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) (www.atsdr.cdc.gov), los compuestos fenólicos son considerados prioritarios por su elevada toxicidad y recalcitrancia en suelos y aguas. En particular, el fenol se encuentra ubicado en la posición 65 en la lista de contaminantes prioritarios de la US EPA.

El efecto adverso sobre los seres vivos se debe a la toxicidad inespecífica relacionada con su hidrofobicidad y a la generación de especies reactivas del oxígeno tornándose en una sustancia tóxica (EPA, 2002; Iurascu y col., 2009). En el hombre y animales puede provocar, irritación e inflamación del riñón, daño hepático y hemólisis, entre otras patologías, así como también puede producir alteraciones en la reproducción y desarrollo, neurotoxicidad, y acciones teratogénicas y cancerígenas (Zhao y col., 1995; Bukowska y Kowalska, 2004). En los ambientes acuáticos, aún en bajas concentraciones (1 mg/L), el fenol posee efectos adversos sobre todos los niveles tróficos, incluyendo anfibios anuros, peces y crustáceos, por lo que puede causar graves alteraciones en esos ecosistemas (Hage y Dijk, 2002; Paisio y col., 2009; Park y col., 2012). En plantas, produce inhibición de la germinación, reducción del crecimiento y desarrollo de plántulas y clorosis, entre otros (Jha y col., 2013; Zhou y col., 2013).

Debido a la alta toxicidad que poseen los compuestos fenólicos, cuando su concentración excede los límites permisibles de descarga a cuerpos de agua naturales, se torna imprescindible la aplicación de medidas efectivas para su tratamiento, con la finalidad de reducir las concentraciones de fenoles a los límites establecidos para su disposición final. De esta manera, se disminuiría el riesgo que estos contaminantes representan para la especie humana y para la vida silvestre.

1.3. Tecnologías para la remediación de contaminantes

Existen diversas tecnologías de tratamiento para la remoción de contaminantes, las cuales varían según el tipo de sustrato contaminado (suelos, sedimentos, cuerpos de agua, efluentes industriales).

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de acuerdo a su naturaleza en físico-químicas y biológicas. Los métodos físico-químicos fueron los primeros en ser desarrollados; entre ellos, se pueden mencionar la extracción con solventes, adsorción, oxidación química e incineración. Representan los métodos más utilizados actualmente por la reducción significativa de volúmenes contaminados y el breve periodo de tiempo que requieren, aunque muestran una serie de limitaciones: son costosos y complejos operativamente, muchos son ambientalmente destructivos, generan subproductos peligrosos que deben tratarse e implican alto consumo de químicos y energía (Basha y col., 2010; Fernández, 2014).

Por otro lado, los métodos de remediación biológicos son aquellos procesos por medio de los cuales, una o varias sustancias contaminantes presentes en un sistema son removidas, degradadas o transformadas (total o parcialmente), mediante el empleo de organismos vivos (Gerhardt y col., 2009). Estos métodos presentan ciertas desventajas, como el requerimiento de prolongados tiempos de tratamiento (meses o años), demanda de condiciones climáticas, geológicas y nutricionales específicas y controladas, además de ser métodos altamente específicos. Sin embargo, las tecnologías de remediación biológica poseen ventajas como bajo costo de capital y operativos, sencilla implementación, diversidad de compuestos tóxicos que pueden ser tratados y aplicabilidad *in situ* que permite abarcar extensas superficies evitando la contaminación por transporte del material, logrando alta aceptación pública dado su carácter de tecnología limpia (Khan, 2004; Liu y col., 2013; Fernández, 2014). Entre estas tecnologías, aquella que implica el uso de

microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) para la remoción de contaminantes, lleva el nombre de biorremediación, el empleo de algas se denomina ficorremediación, mientras que el de plantas se denomina más estrictamente fitorremediación. En los últimos años, han emergido la vermirremediación y la rizorremediación como tecnologías alternativas que implican el uso de nemátodos y la acción conjunta de microorganismos rizosféricos y plantas, respectivamente (Sinha y col., 2010).

1.3.1. La fitorremediación como una herramienta de remediación ambiental

La fitorremediación se basa en un conjunto de mecanismos por parte de las plantas, que tiene como consecuencia la reducción *in situ* o *ex situ* de la concentración de diversos compuestos a partir de procesos bioquímicos realizados por las mismas. La fitorremediación ha ganado interés en los últimos años dada su inocuidad con el ambiente, ya que permite aprovechar las capacidades y sistemas enzimáticos propios de los tejidos vegetales para el tratamiento de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos o inorgánicos (Pilon-Smits y Freeman, 2006). Los procesos que tienen lugar en las plantas incluyen reducción, transformación, mineralización, degradación, volatilización o estabilización de contaminantes (Cherian y Oliveira, 2005; Eapen y col., 2007; Cho y col., 2008; Wang y col., 2011). Esta tecnología biológica muestra una serie de ventajas y limitaciones en comparación con otras tecnologías convencionales, las cuales se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la fitorremediación

Ventajas	Desventajas
<ol style="list-style-type: none">1. Se puede realizar <i>in situ</i> y <i>ex situ</i>.2. Se realiza sin necesidad de transportar el sustrato contaminado, con lo que se disminuye la diseminación de contaminantes a través del aire o del agua.3. Es una tecnología sustentable.4. Es eficiente tanto para contaminantes orgánicos como inorgánicos.5. Es de bajo costo.6. No requiere personal especializado para su manejo.7. No requiere consumo de energía.8. Sólo requiere de prácticas agronómicas convencionales.9. Es poco perjudicial para el ambiente.10. Actúa positivamente sobre el suelo, mejorando sus propiedades físicas y químicas, debido a la formación de una cubierta vegetal.11. Tiene una alta probabilidad de ser aceptada por el público, ya que es estéticamente agradable.12. Evita la excavación y el tráfico pesado.13. Se puede emplear en agua, suelo, aire y sedimentos.14. Permite el reciclado de recursos (agua, biomasa, metales).	<ol style="list-style-type: none">1. En especies como los árboles o arbustos, la fitorremediación es un proceso relativamente lento.2. Se restringe a sitios de contaminación superficial dentro de la rizosfera de la planta.3. El crecimiento de las plantas está limitado por concentraciones tóxicas de contaminantes, por lo tanto, es aplicable a ambientes con concentraciones bajas de los mismos.4. En el caso de la fitovolatilización, los contaminantes acumulados en las hojas pueden ser liberados nuevamente al ambiente.5. Los contaminantes acumulados en maderas pueden liberarse por procesos de combustión.6. No todas las plantas son tolerantes o acumuladoras.7. La solubilidad de algunos contaminantes puede incrementarse, resultando en un mayor daño ambiental o migración de contaminantes.8. Se requieren áreas relativamente grandes.9. En sistemas acuáticos se puede favorecer la diseminación de plagas, tales como los mosquitos.

Tabla extraída de Delgadillo-López y col., (2011)

1.3.2. Fitorremediación mediante la utilización de plantas acuáticas

Entre las alternativas de fitorremediación, se encuentra la fitorremediación acuática cuando es aplicada a muestras líquidas. En la misma, el mecanismo de remediación depende de la captación del contaminante, así como de las características fisiológicas, anatómicas y morfológicas de cada especie (Sasmaz y col., 2016). La fitorremediación puede remediar contaminantes orgánicos e inorgánicos, aunque los mecanismos de absorción en las plantas varían para cada contaminante, por lo que la selección de las especies de plantas es un factor importante por considerar (Dhir, 2013). Actualmente, este es un método que se considera de gran utilidad, ya que la biomasa cosechada de algunas plantas puede ser aprovechada como fuente de energía, forraje y fibra.

El fundamento de esta estrategia consiste en que los contaminantes son adsorbidos o incorporados dentro de la planta a través de la raíz (rizofiltración) o también por las hojas (fitofiltración), logrando reducir o, en algunos casos, eliminar la contaminación del agua y favorecer la restauración de la calidad de la misma. En términos generales, algunas macrófitas acuáticas son adecuadas para fitorremediar, ya que presentan alta productividad de biomasa, alta eficiencia de remoción de contaminantes, elevada predominancia bajo condiciones ambientales adversas, adaptabilidad al clima de la región, capacidad de transporte de oxígeno de la superficie a la rizosfera, y fácil cosecha (Ansola, 2003).

Específicamente, para la eliminación de fenoles, existen algunos antecedentes sobre remediación por macrófitas acuáticas, tales como aquellos reportados por Ensley y col. (1997), Sweidan y Fayyad (2006), y Abdallah (2013). Además, hay estudios sobre exposición de macrófitas acuáticas, *Lemna* sp., a otros compuestos orgánicos como el detergente dodecilsulfato sódico (SDS) y el dicloro difenil tricloroetano (DDT) (Gao y col., 2000; Forni y col., 2012). En la provincia de Córdoba existen varias plantas acuáticas descritas como potenciales fitorremediadoras, entre ellas especies de los géneros *Hydrocotyle*, *Typhia*, *Azolla*, *Pistia* y *Elodea* (Fernández, 2014). Más aún, la fitorremediación empleando especies acuáticas ha demostrado además ser viable para el tratamiento de efluentes, entre ellos los que se caracterizan por su alta carga de materia orgánica (Nuñez López y col., 2004).

1.3.2.1. Características y aplicación de plantas acuáticas del género *Lemna* en fitorremediación

Las plantas del género *Lemna* junto a otros 4 géneros (*Spirodela*, *Landoltia*, *Wolffia* y *Wolffiella*), pertenecen a la familia *Araceae*, subfamilia *Lemnoideae*, conformando una familia de plantas acuáticas de libre flotación (Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, APG IV). En el pasado, otros investigadores han clasificado al Género *Lemna* (denominadas lentejas de agua) en una familia separada, *Lemnaceae*. En las Figuras 2 y 3 se encuentran representados los diferentes géneros de la familia y sus características.

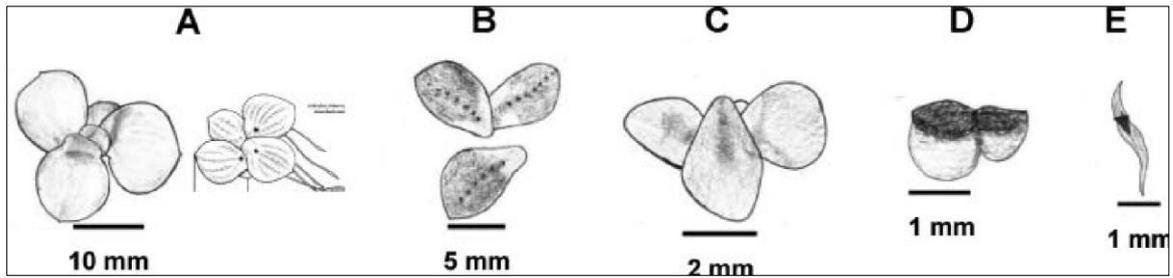


Figura 2. Géneros de la familia Araceae. (A) *Spirodela* (colonia de 5 hojas de *Spirodela polyrhiza* y colonia de 4 hojas con raíces) (B) *Landoltia* (3 hojas de *Landoltia punctata*); (C) *Lemna* (3 hojas de *Lemna minor*); (D) *Wolffia* (hojas de *Wolffia arrhiza*); (E) *Wolffiella* (hoja de *Wolffiella gladiata*). Las hojas del Género *Spirodela* tienen de 7 a 11 raíces, aquellas de *Landoltia* hasta 7, *Lemna* presenta una sola raíz, mientras *Wolffia* y *Wolffiella* no poseen raíces (Extraído de Ziegler y col., 2016).

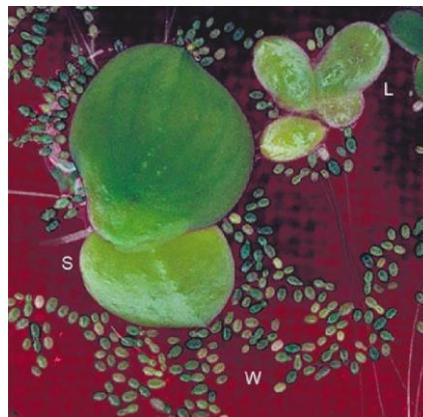


Figura 3. Comparación de individuos de Géneros de la familia Araceae: (S) *Spirodela* (L) *Lemna* (W) *Wolffia* (Extraído de Landesman y col., 2011).

Los distintos géneros de esta Familia poseen una parte aérea que representan la fusión entre las hojas y los tallos y constituyen la máxima reducción del sistema vascular en plantas. El cuerpo vegetativo de estas plantas está fuertemente simplificado como resultado de un proceso adaptativo a un medio acuático. Bajo condiciones adversas, como bajas temperaturas o desecación, aparecen estructuras denominadas turiones que se hunden hasta el fondo del cuerpo de agua. Estos turiones pueden dar lugar a generaciones de nuevas plantas ante condiciones favorables de luz, humedad y temperatura (Landesman y col., 2011).

El género *Lemna* fue descrito por Linneo, y publicado en 1753, comprende a la especie tipo *Lemna minor*. En la Figura 4 se puede observar ésta y otras especies del género. Las hojas son membranáceas, planas, elípticas a lineares, simétricas o asimétricas, redondeadas en el ápice, con 1 a 3 nervios y con 1 a 3 pápulas, sin puntos prominentes y presentan una única raíz. Características mencionadas en numerosos estudios, los cuales

señalan a especies del género *Lemna* en programas de fitorremediación de aguas contaminadas, debido a su capacidad para crecer en amplios rangos de temperatura, pH y nivel de nutrientes (Landesman y col., 2011). Estas plantas son capaces, a través de procesos intracelulares y/o extracelulares, de eliminar eficientemente y/o transformar diferentes xenobióticos orgánicos presentes en ambientes acuáticos. En este sentido, Reis y col. (2014) demostraron que varias macrófitas, incluidas *S. polyrhiza* y *L. aoukikusa* [idéntica a *Lemna aequinoctialis* según Borisjuk y col. (2015)], eliminaron por completo al término de 6 días compuestos fenólicos tales como bisfenol y 2,4-diclorofenol, que estaban presentes en altas concentraciones en ambientes acuáticos. Es importante mencionar que éstos compuestos son altamente tóxicos y tienen efecto como disruptores endocrinos, de modo que presentan un impacto negativo sobre la vida acuática y la salud de los seres humanos. En este caso, las hojas presentaron baja acumulación de estos compuestos ya que los mismos sufrieron mayormente degradación oxidativa por peroxidasas unidas a la pared celular de los tallos. Otros autores, describieron que las peroxidasas extracelulares, liberadas por otras especies del género *Lemna* al medio de crecimiento en respuesta a fenoles halogenados, fueron las implicadas en la decloración oxidativa de 2,4,6-triclorofenol (Jansen y col., 2004).



Figura 4. Especies del género *Lemna* 1) A) *Lemna minor* (lenteja de agua), B) *Lemna gibba*, C) *Lemna trisulca* y D) *Lemna minuta*.

En nuestro trabajo se utilizó una macrófita acuática que fue inicialmente identificada como *Lemna* sp, y luego identificada a nivel de especie como *Lemna minuta* Kunth (Figura 5).

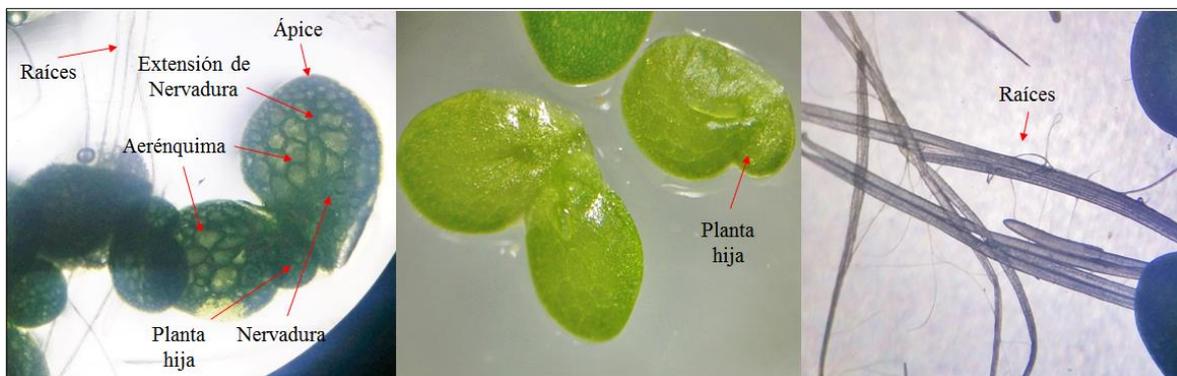


Figura 5. Plantas de *L. minuta* Kunth y su morfología bajo observación con lupa (10X). La disposición de las células parenquimáticas con cloroplastos del tejido especializado aerénquima, deja espacios intercelulares, los cuales proporcionan flotabilidad.

Lemna minuta Kunth, una especie autóctona de Córdoba fue recogida por nuestro grupo de trabajo a partir de un humedal de Elena (Córdoba) contaminado con efluentes de curtiembre. En estudios previos se determinó que esta especie fue capaz de remover simultáneamente compuestos orgánicos e inorgánicos (Fernández, 2014; Paisio y col., 2018).

1.3.3. Mecanismos de remoción de compuestos fenólicos en plantas

En los procesos de fitorremediación de contaminantes orgánicos se tienen en cuenta los siguientes aspectos: metabolismo de los contaminantes en el interior y exterior de la planta (rizosfera) (estabilización), los procesos que conducen a su completa degradación o mineralización, y/o la absorción de estos a la superficie radical (Reichenauer y Germida, 2008).

La presencia y actividad de una gran diversidad de enzimas, no necesariamente conectadas fisiológicamente, forma una cascada metabólica que lleva a cabo la translocación, metabolismo y/o secuestro/adsorción de los xenobióticos (Schröder y col., 2008). De acuerdo con lo mencionado anteriormente, las plantas son capaces de metabolizar los compuestos orgánicos a través de tres pasos secuenciales que guardan similitud con las reacciones de detoxificación en el hígado humano, de allí que el modelo

propuesto por Sandermann (1994) para el metabolismo de compuestos orgánicos se denominó “hígado verde” (en inglés “*green liver*”) (Agostini y col., 2011; Delgadillo-López y col., 2011; Dhir, 2013); este modelo consta de tres fases:

- Fase I (Transformación): Involucra la conversión/activación (oxidación, reducción e hidrólisis) de los compuestos orgánicos (Komives y Gullner, 2005). En el caso de los fenoles, si bien los procesos bioquímicos que acompañan su detoxificación han sido escasamente estudiados, se sabe que la actividad de lacasas, otras fenol-oxidasas y peroxidasas, son esenciales para su transformación.
- Fase II (Conjugación): Permite la conjugación de los metabolitos de la fase I a una molécula hidrofílica endógena como los azúcares, aminoácidos y glutatión (Dietz y Schnoor, 2001), dando como resultado la formación de compuestos de alto peso molecular, más polares y menos tóxicos en comparación con el compuesto original. Con respecto a los compuestos fenólicos, éstos pueden conjugarse con glucosa, ácido glucurónico y péptidos de bajo peso molecular, entre otros, en diferentes proporciones según el compuesto inicial y la especie vegetal. También se ha descrito la conjugación directa con lignina, mediante uniones covalentes a este biopolímero. Resulta interesante destacar, en este punto, que la conjugación no lleva a la degradación del compuesto, el que sigue preservando su estructura molecular, es decir, que sólo se reduce su toxicidad parcialmente (Agostini y col., 2011). Se ha demostrado la glicosilación *in vitro* de fenoles simples, este mecanismo típico de desintoxicación ha sido reportado para el metabolismo del fenol, 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) y 2,4,5-triclorofenol (2,4,5-TCP) en *Lemna gibba* en donde se detectaron conjugados de β -glucósidos como productos finales del metabolismo fenólico, que fueron deshalogenados progresivamente (Ensley y col., 1997). Sin embargo, cuando se investigó el destino metabólico de 2,4-DCP en seis macrófitas, el conjugado 2,4-DCP-glucósido se describió como un metabolito intermedio (Pascal-Lorber y col., 2004). Day y Saunders (2004) han caracterizado glucósidos derivados del 2,4-DCP y 2,4,5-TCP más complejos, tales como la glucosa apiosa, o el conjugado hidroximetil-3-tetrosa en *Lemna minor*. Este tipo de reacciones toman lugar en el citosol en donde diferentes enzimas, tales como *o*-glucosiltransferasa, N-glucosiltransferasa, N-maloniltransferasa, glutatión S-transferasa, etc, participan en la detoxificación de contaminantes. Mediante este proceso ocurre la formación de uniones peptídicas, éter, éster, tioéter u otros enlaces de naturaleza covalente. En el caso de enzimas peroxidasas, éstas se hallan

involucradas principalmente en la degradación de los fenoles y han sido reportadas en rábano picante (*Armoracia rusticana*). Otras enzimas como las fosfatasas, encargadas de la escisión de grupos fosfato de los pesticidas organofosforados, han sido reportadas en *Spirodela polyrhiza* (Susarla y col., 2002).

- Fase III (Compartimentalización): Promueve la compartimentalización de los compuestos orgánicos modificados, subdividida en dos fases independientes, una de ellas relacionada con el transporte y almacenamiento en las vacuolas y la otra, con la formación de enlaces con componentes de la pared celular como la lignina y la hemicelulosa o la excreción de estos hacia la pared celular (Abhilash y col., 2009).

En la Figura 6, se pueden apreciar algunos mecanismos utilizados por las plantas en la captura, transporte, metabolismo y degradación de compuestos fenólicos.

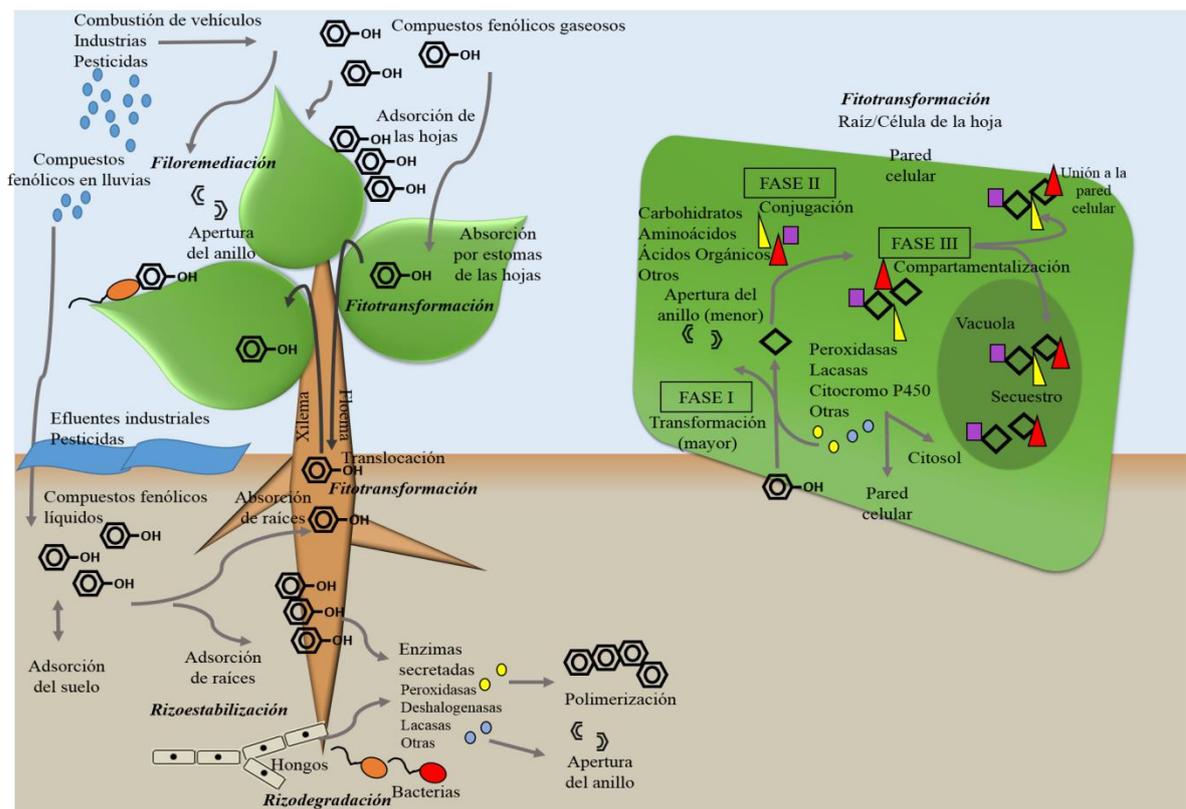


Figura 6. Representación esquemática de los mecanismos involucrados en la transformación de compuestos fenólicos (Figura extraída y modificada de Agostini y col., 2011).

En el caso de especies de plantas acuáticas la transformación de compuestos fenólicos consiste en una captación rápida o secuestro seguido de transformación o

degradación, ya sea reductiva u oxidativa y, por último, asimilación de metabolitos por unión covalente a determinados grupos químicos de las células vegetales. El potencial que poseen las plantas acuáticas para secuestrar contaminantes orgánicos depende de una cutícula rica en lípidos (que ayuda en el secuestro de compuestos orgánicos lipofílicos), la especie, la composición bioquímica de los tejidos vegetales y las propiedades físico-químicas tales como: solubilidad acuosa, hidrofobicidad (K_{ow}), volatilidad del contaminante y peso molecular de los compuestos orgánicos (Dhir, 2013).

1.3.3.1. Rol de las peroxidasas en la remoción de fenoles

La remoción de diferentes contaminantes fenólicos, como se ha mencionado, es llevada a cabo mediante el empleo de oxidasas vegetales, principalmente lacasas y peroxidasas (Singh y col., 2008; Coniglio y col., 2008; González y col., 2008). Éstas son enzimas producidas y exudadas principalmente, por las raíces de las plantas, particularmente en respuesta a estrés (Hirata y col., 2000). Las peroxidasas (EC 1.11.1.) son enzimas óxido-reductasas que utilizan el H_2O_2 como co-sustrato. Son abundantes en plantas y actúan como componentes esenciales de procesos fisiológicos claves, como la regulación del crecimiento y la expansión celular, el desarrollo de las plantas y las respuestas al ataque de patógenos y heridas (Hiraga y col., 2001). Estas enzimas están asociadas con la formación de lignina y la deposición de residuos aromáticos de suberina en la pared celular. En particular, las peroxidasas vegetales generan radicales libres de compuestos denominados monolignoles, como el alcohol coniferílico con estructura fenilpropanoide: un anillo fenólico y una cadena tipo propano (C3) en posición *para* respecto al grupo alcohol (OH), que se acoplan no enzimáticamente entre ellos para generar dímeros y polímeros secuencialmente. La repetición de este proceso (oxidación enzimática seguida de acoplamiento no enzimático) tiene como resultado la formación de lignina (Croteau y col., 2000), la cual forma parte de la pared celular junto con otros polímeros como la suberina y cutinas (Figura 7). La función de la lignina está asociada con el aporte de resistencia al tejido vegetal frente a patógenos, actúa como antioxidante y da rigidez y resistencia a las paredes sin afectar la permeabilidad. La deposición principal, ocurre en el xilema, aunque también se deposita en paredes de las células que forman la exodermis, que es la capa más superficial de la raíz (Lagunes-Fortiz y Zavaleta-Mejía, 2016).

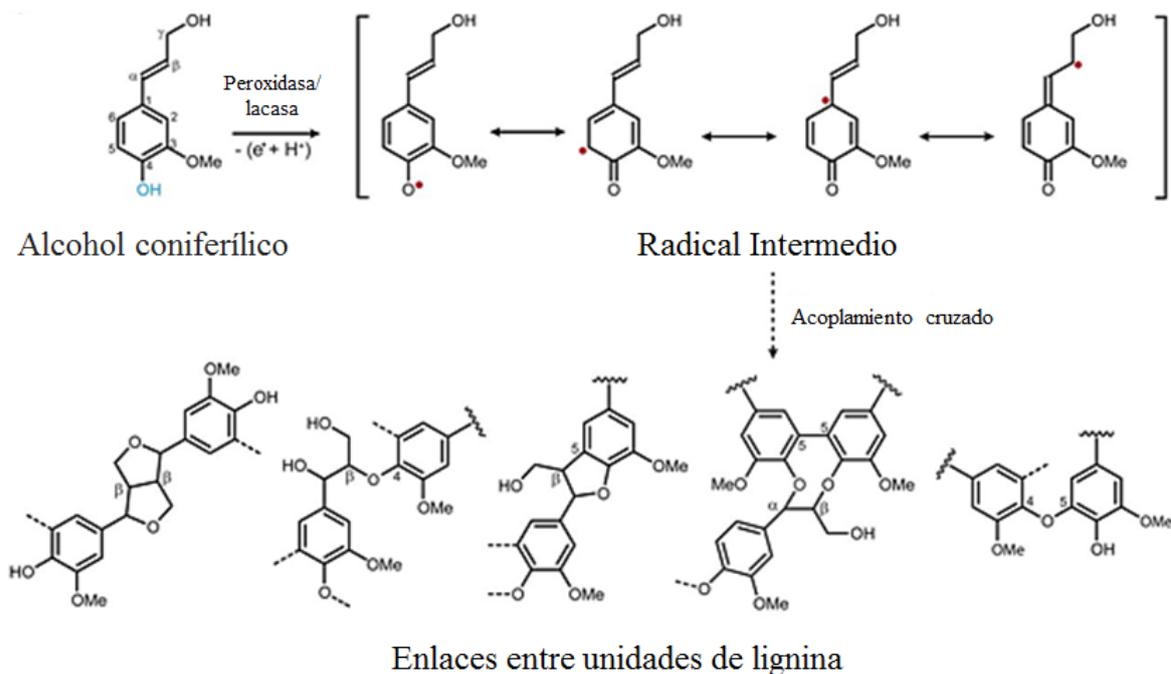


Figura 7. Radicales libres intermediarios generados a partir de un monolignol natural (alcohol coniferílico) por oxidación de su fenol por peroxidasa y/o lacasa. Los radicales fenoxi se acoplan entre ellos o, lo que es más importante, con el polímero de lignina en crecimiento produciendo unidades con diferentes enlaces (Imágenes extraídas de Zhang y col., 2012).

El conocimiento del proceso de la formación de lignina a partir de compuestos fenólicos que son naturales de las plantas (monolignoles) ha permitido aplicar esta propiedad de las plantas y sus enzimas a la remoción de compuestos de esta naturaleza que se encuentran contaminando el medio ambiente, de manera tal que polimerizados con componentes de pared celular, los mismos quedan biológicamente inaccesibles, dando lugar al proceso de compartimentalización (Talano y col., 2010; Rodríguez-Hernandez y col., 2017; Pandey y col., 2017).

Además, se han asociado cambios en los patrones de lignosuberización de tejidos vegetales en respuesta a estrés, dado que estos depósitos pueden restringir el flujo apoplástico de agua conteniendo diversos compuestos (Talano y col., 2010). También ha sido reportado que raíces transformadas de plantas de diversos tipos pueden remover fenoles de manera eficiente, mediante la producción de peroxidasa que catalizan su oxidación y polimerización utilizando H_2O_2 endógeno o exógeno como agente oxidante. Por lo tanto, estas enzimas pueden desempeñar un papel importante en las reacciones de polimerización de los fenoles, quedando así adsorbidos a la pared celular (Harvey y col., 2002).

En la Figura 8 se muestra el mecanismo de descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a H_2O simultáneamente con la oxidación de una amplia variedad de compuestos fenólicos y/u otros sustratos no fenólicos (RH) mediado por las peroxididasas:

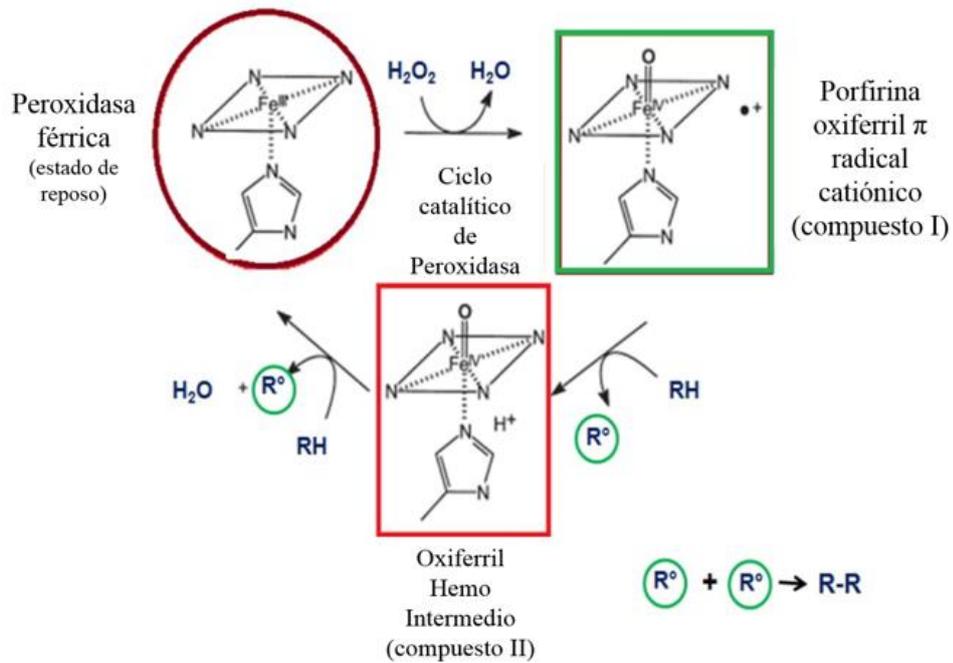
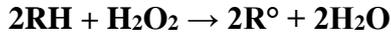


Figura 8. Ciclo catalítico de las peroxididasas. Se muestra la reacción de óxido-reducción que ocurre en el centro del grupo hemo de la enzima, el H_2O_2 se degrada a H_2O y se polimeriza el equivalente reductor (RH). (Extraído y modificado de Pandey y col., 2017).

Por otro lado, la degradación de fenol en bacterias es bien conocida. En éstas se han reportado dos vías de transformación de fenol, la vía *orto* y la vía *meta* dependiendo de la posición de escisión del anillo (El-Sayed y col., 2003; Agarry y Solomon, 2008) (Figura 9). Ambas vías conducen a la mineralización completa del fenol obteniéndose CO_2 y H_2O .

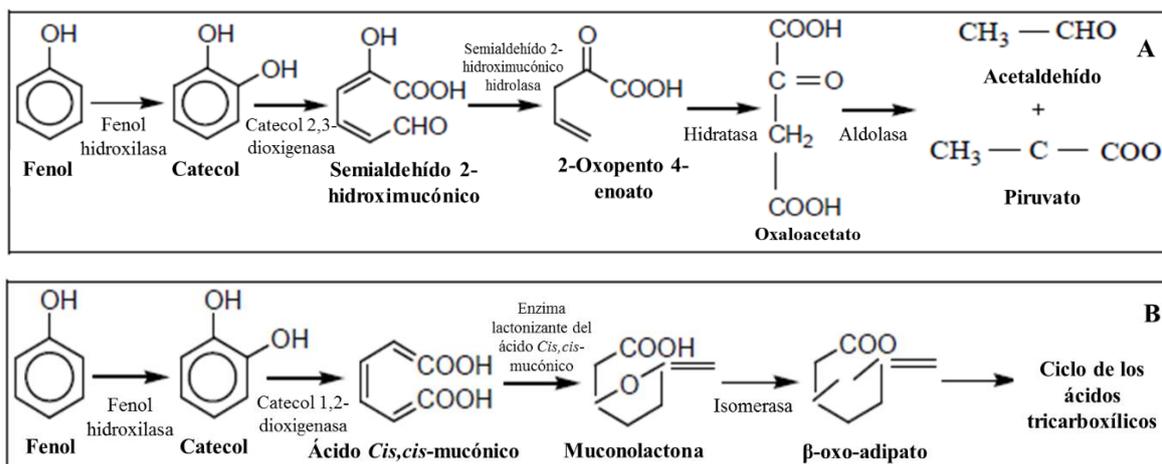


Figura 9. Vías de degradación de fenol en bacterias A) Degradación de fenol en bacterias a través de la vía *meta*. B) Vía *orto* de degradación (Figura adaptada de Kolhe y col., 2015).

Sin embargo, en plantas existen pocos reportes al respecto, habiéndose mencionado en un comienzo que los compuestos fenólicos rara vez se mineralizaban (Schnoor y col., 1995; Schröder y Collins, 2002). Sin embargo, otros autores (Ugrekheldze y col., 1997, 1999) con relación a fenol, encontraron ácido mucónico y fumárico marcado en plantas expuestas a benceno o fenol marcados, lo que indicaría la capacidad de estas para metabolizar estos compuestos a través de la vía que involucra la escisión del anillo fenólico. Así se generaría ácido mucónico y posteriormente el ácido fumárico por β -oxidación, el cual entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Mithaishvilia y col., 2005). Más recientemente, Jha y col. (2013) demostraron en *Helianthus annuus* L. que la degradación completa de fenol a través de la ruptura del anillo fenólico por fenol hidroxilasas produjeron ácido *cis,cis*-mucónico y ácido fumárico, los cuales son intermediarios del ciclo de Krebs.

1.3.4. Fitorremediación de efluentes industriales utilizando macrófitas acuáticas/especies del género *Lemna*

Diferentes tipos de industrias generan una continua contaminación de la biósfera debido a la liberación de sus efluentes sin un tratamiento previo (Carlos y col., 2016). Entre ellas, la industria del curtido de cueros (curtiembres), como se mencionó anteriormente, se reconoce mundialmente como una de las más contaminantes, ya que durante el curtido se generan importantes volúmenes de residuos con una combinación

extremadamente compleja de compuestos orgánicos e inorgánicos (materia orgánica, cromo, fenoles, sólidos disueltos y sulfuros), lo que hace que sean altamente contaminantes (Okoduwa y col., 2017).

Con el fin de evitar un impacto ambiental negativo fruto del vertido de efluentes, se han diseñado una diversidad de estrategias para tratarlos antes de su liberación. El procedimiento más ampliamente utilizado en plantas de tratamiento de efluentes incluye un tratamiento primario (químico) y uno secundario (biológico) (Dotro y col., 2010). Sin embargo, se sabe que la adición de un tratamiento terciario (fitorremediación), permite mejorar la calidad de aguas liberadas al ambiente, ya que tiene como finalidad eliminar la carga orgánica residual y aquellas otras sustancias contaminantes no eliminadas por los tratamientos secundarios, por ejemplo, carbono, fósforo y nitrógeno (Langer y col., 2017).

Entre las plantas seleccionadas como potenciales fitorremediadoras, algunas macrófitas acuáticas son adecuadas, ya que presentan alta productividad de biomasa, alta eficiencia de remoción de contaminantes y adaptación a condiciones adversas, entre otras ventajas (Maine y col., 2016; Barbieri de Souza y Rodrigues Silva, 2019). Se ha descrito que las “lentejas de agua” (*Lemna sp.*) y el “pasto vetiver” (*Chrysopogon zizanioides*) son eficaces para este fin (Scavo y col., 2004; Morales y Caldas, 2009). Además, diversos autores han demostrado la remoción eficiente de materia orgánica por plantas palustres (Calheiros y col., 2014; Sharma y col., 2015; Di Luca y col., 2015). De allí que existe un gran potencial entre las especies vegetales existentes para su uso en fitorremediación. Sin embargo, de acuerdo con nuestro conocimiento, hay pocos antecedentes sobre el uso de plantas acuáticas y/o palustres para el tratamiento de efluentes de curtiembre *in situ* (Dotro y col., 2010; Calheiros y col., 2014) y menos aún con plantas nativas de nuestra región.

Basado en lo anterior, existen escasos reportes acerca de los mecanismos involucrados en la remoción de fenol utilizando macrófitas acuáticas, especialmente aquellas nativas de nuestra región. Por ello, resulta interesante profundizar los estudios de remediación y metabolismo de fenol empleando *Lemna minuta* Kunth como posible alternativa eco-amigable con el ambiente para la remoción de fenoles y el tratamiento de efluentes industriales.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.HIPÓTESIS

Lemna minuta Kunth, especie adaptada a las condiciones ambientales de zonas contaminadas, es capaz de remediar eficientemente fenol presente en aguas y materia orgánica de efluentes industriales, constituyendo una adecuada herramienta biotecnológica para el saneamiento ambiental. Las peroxidasas son las enzimas mayormente implicadas en el proceso de remediación de fenol e inducen una mayor ligno-suberización de los tejidos vegetales.

2.2.Objetivo General

El **objetivo general** de este proyecto consistió en estudiar la fitorremediación de fenol de soluciones sintéticas y de materia orgánica de efluentes de curtiembre, utilizando una macrófita acuática (*Lemna minuta* Kunth) y dilucidar algunos mecanismos bioquímicos implicados en el proceso.

2.3.Objetivos Específicos

- 1) Evaluar la capacidad de remoción de fenol de soluciones sintéticas utilizando la especie autóctona *L. minuta* Kunth.
- 2) Evaluar la participación de peroxidasas vegetales en el proceso de remoción de fenol a través de la cuantificación de su actividad enzimática en la parte aérea y raíz, a distintos tiempos del proceso de remoción y analizar cambios en los perfiles de isoenzimas.
- 3) Analizar y comparar macroscópicamente presencia y distribución de lignina/suberina a través de tinciones específicas y mediante análisis microscópico de cortes transversales de raíces control y tratadas con fenol.
- 4) Determinar la capacidad de remoción de materia orgánica de efluentes de curtiembre por *L. minuta* Kunth.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Se utilizó la especie vegetal *Lemna minuta* Kunth, una especie acuática recolectada de un humedal de Elena (Córdoba) (32°34'08,24''S, 64°22'27,82''O). Este humedal está conformado por las nacientes del arroyo El Barreal, el propio arroyo que lo drena y el aporte de efluentes provenientes de una curtiembre local. Esta especie fue identificada en un trabajo previo por la utilización de claves dicotómicas efectuado por personal especializado (Cátedra de Botánica Sistemática, Departamento de Ciencias Naturales, FCEFQyN, UNRC) y seleccionada por su capacidad de crecimiento y reproducción vegetativa *in vitro* (Fernández, 2014; Paisio y col., 2018). Las plantas acuáticas fueron mantenidas por largos periodos de tiempo en bandejas conteniendo agua corriente en invernadero sin incidencia de luz directa. Previo al inicio de los ensayos, fueron trasladadas a cámara de crecimiento Conviron (modelo E15, Winnepeg, Canadá) con una intensidad de luz de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$, 70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) (Paisio y col., 2018). Las mismas fueron colocadas en bandejas conteniendo agua de red y/o alternativamente medio líquido Hoagland diluido 1/2 (Hoagland and Arnon, 1950) (Ver anexo) esterilizado por autoclave. Estas condiciones de cultivo fueron determinadas como óptimas para su crecimiento *in vitro* en estudios previos (Fernández, 2014; Paisio y col., 2018). Para su uso en ensayos en condiciones de esterilidad, las mismas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 0,3% y fueron posteriormente lavadas en agitación (3 veces) durante 5 min, empleando agua destilada estéril.

3.2. Ensayos de remoción de fenol

Se evaluó la remoción de fenol (100 y 200 mg/L, marca comercial Sigma) en medio líquido, estableciendo la eficiencia de remoción en el transcurso de tiempos cortos (3 y 6 horas) y más prolongados (2 y 5 días). Las concentraciones seleccionadas se basaron en estudios previos de tolerancia de esta especie vegetal frente a fenol (Fernández, 2014).

Para los ensayos de remoción, una biomasa entre 100-130 mg fue inoculada en frascos Erlenmeyers de 50 mL conteniendo 25 mL de medio de cultivo Hoagland diluido

1/2 estéril y suplementado con las correspondientes concentraciones de fenol. A su vez, se realizaron los respectivos controles con solución de fenol sin plantas y controles con plantas en medio Hoagland sin fenol inoculado para evaluar el crecimiento de las mismas. El primero de los controles, sin plantas, se realizó con el propósito de evaluar potenciales pérdidas de solución por evaporación. Se evaluó la eficiencia de remoción a través de la cuantificación espectrofotométrica de fenol empleando el método colorimétrico descrito por Wagner y Nicell (2002) (Sección 3.5). Al término de los ensayos las plantas se cosecharon, se registró el peso húmedo y se conservaron a -80°C para la determinación de actividad enzimática.

3.3. Ensayos de reutilización de plantas para ensayos consecutivos de remoción

Para los ensayos de reutilización de biomasa, se realizaron experimentos de remoción de fenol (100 y 200 mg/L) como fue descrito previamente en la sección 3.2. Al término de ciclos de 3-4 días, las plantas fueron transferidas a nuevas soluciones de fenol. Este procedimiento se repitió durante un periodo de 30 días. Previo al recambio de la solución para cada ciclo, se determinó la concentración de fenol residual como se indica en la sección 3.5. Se realizaron, además, controles con fenol sin plantas, los cuales fueron usados para determinar el contenido total del contaminante. Estos resultados fueron expresados como porcentaje de eficiencia de remoción de fenol.

3.4. Ensayos de remoción con agregado de H_2O_2

Se evaluó la remoción de fenol (100 mg/L) en medio líquido según lo descrito en el punto 3.2 con la adición de H_2O_2 para dilucidar la participación de enzimas peroxidasas que podrían estar utilizándolo como co-sustrato. Con el propósito de determinar las concentraciones óptimas de H_2O_2 se evaluaron diferentes concentraciones (1, 3, 5 y 7 mM) que fueron escogidas teniendo en cuenta estudios previos (Coniglio y col., 2008; González y col., 2008). Se realizaron los respectivos controles no inoculados (sin planta) que contenían fenol (100 mg/L) y las distintas concentraciones usadas de H_2O_2 . También se empleó como control una solución de fenol (100 mg/L) inoculada con plantas sin H_2O_2 . Se evaluó la eficiencia de remoción luego de distintos períodos de tiempo durante 48 horas, a

través de la cuantificación de fenol, empleando el método colorimétrico descrito por Wagner y Nicell (2002).

3.5. Determinación colorimétrica de fenol

La determinación de fenol se realizó según la técnica descrita por Wagner y Nicell (2002), cuya mezcla de reacción consistió en:

- 700 μL de bicarbonato de sodio 0,25 M pH 8,4
- 100 μL de 4-aminoantipirina 20,8 mM
- 100 μL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 83,4 mM

Se agregó 100 μL de muestra y la mezcla fue homogeneizada en un agitador vórtex, e incubada durante 6 min a temperatura ambiente. Finalmente, se leyó la absorbancia a 510 nm.

La técnica se basa en que, bajo condiciones de alcalinidad, el primer amino de la 4-aminoantipirina ejerce un ataque electrofílico sobre la posición *para* del compuesto fenólico, formando un compuesto intermediario. Este es subsecuentemente oxidado por ferricianuro de potasio a un tipo de quinona de tinte rojo que absorbe la luz a una longitud de onda de 510 nm cuando se completa la reacción. La absorbancia es proporcional a la concentración de fenol presente en la muestra. El valor obtenido de fenol residual fue referido a su control 100% (solución de fenol en la concentración correspondiente) y expresado como porcentaje de eficiencia de remoción.

3.6. Participación de peroxidasas en el proceso de remoción de fenol

3.6.1. Evaluación de actividad peroxidasa y de perfiles electroforéticos de plantas control y tratadas con fenol

Se evaluó la participación de peroxidasas en el proceso de remoción de fenol a través de la cuantificación de la actividad enzimática en hojas y raíces a distintos tiempos post-remoción. También se evaluaron los perfiles de isoenzimas de peroxidasas de plantas control y tratadas con fenol.

3.6.1.1. Obtención de extracto crudo vegetal

En primera instancia se separó la parte aérea de la raíz de plantas control y tratadas con fenol para el análisis de actividad peroxidasa, sin embargo, en lo sucesivo se trabajó con plantas enteras, dado a lo laborioso de esta técnica. Para la extracción de peroxidasa, se homogeneizó el tejido empleando buffer NaAc/HAc 50 mM pH 5, con la adición de KCl 1 M, en una proporción 1:5. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante se utilizó para la determinación de actividad enzimática.

3.6.1.2. Determinación espectrofotométrica de actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa se determinó por espectrofotometría continua a 37° C, utilizando *orto*-dianisidina (*o*-D) a una concentración final de 0,63 mM y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (0,5 mM) en 1 mL de mezcla de reacción y siguiendo el aumento de absorbancia originado por la aparición del producto de reacción a 470 nm. Para los cálculos de actividad enzimática (UI/mL), se consideró el coeficiente de extinción molar correspondiente (11,3 mM⁻¹ cm⁻¹). La unidad internacional de enzima (UI) se definió como la cantidad de enzima que forma 1 μmol de producto en 1 minuto en las condiciones descritas.

3.6.1.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida catiónica y aniónica

Los perfiles de isoformas de peroxidasa de las plantas de *L. minuta* Kunth fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida catiónica (Reisfeld y col., 1962) y aniónica (Davis, 1964). Para ello, se utilizó un equipo de BioRad, Mini Protean III en minigeles de poliacrilamida al 7,5%. Para las electroforesis catiónicas, se utilizó ácido acético/β-alanina 0,01 M, pH 4 como tampón de corrida y verde de metilo 1×10⁻⁴ % P/V como colorante indicador del frente de corrida. En el caso de las electroforesis aniónicas, se utilizó Tris/glicina pH 8,3 como tampón de corrida y azul de bromofenol al 1×10⁻⁴ % P/V como colorante indicador del frente de corrida.

Las electroforesis se realizaron a voltaje constante (160 voltios) y se corrieron hasta que el frente de corrida alcanzó el borde inferior del gel. El procedimiento se realizó a 4 °C a fin de poder detectar actividad biológica una vez concluida la corrida. La tinción de los

geles fue realizada mediante el uso de bencidina 3,8 mM y H₂O₂ 21 mM en buffer AcNa-AcH 0,5 M pH 4,6 hasta la aparición de bandas (De Forchetti y Tigier, 1990).

3.6.2. Estudios macroscópicos y estructurales de plantas expuestas a fenol

3.6.2.1. Observación macroscópica de plantas expuestas a fenol: Tinción de lignina y suberina

Para evaluar *in situ* los cambios en el patrón de lignosuberización en plantas expuestas a fenol, se empleó la técnica de coloración con fluoroglucinol-HCl. Ésta permite poner en evidencia los grupos aldehídos de la lignina y suberina (Baayen y col., 1996). El principio de la reacción se basa en la interacción de los grupos terminales del alcohol coniferílico de la lignina con el fluoroglucinol para dar un complejo color rojo-violeta. Para ello, las plantas se tiñeron con una solución de fluoroglucinol al 1% (P/V) en solución y HCl durante 3 minutos. Luego se lavaron con agua destilada para quitar el exceso del colorante y se colocaron en portaobjetos con gotas de agua con el fin de evitar la deshidratación. Se colocó un cubreobjetos, se presionó y finalmente el tejido se observó mediante el empleo de lupa estereoscópica binocular (Baires Laboratorio) y las fotografías fueron tomadas con cámara digital acoplada a la misma. Se analizó la tinción de plantas control creciendo en medio Hoagland 1/2 por igual período de tiempo.

3.6.2.2. Estudios estructurales en raíz: Inclusión en parafina, cortes y observación

Raíces de plantas control y tratadas con 100 y 200 mg/L de fenol durante 5 días, se procesaron siguiendo las recomendaciones de D'ambrogio de Argüeso (1986). En primer lugar, se colocaron en solución fijadora FAA (formaldehído, alcohol, acético) [37-40% formaldehído, 95% etanol, ácido acético glacial, agua (5/50/10/35)]. A continuación, las muestras se deshidrataron de acuerdo con los procedimientos descritos por Johansen (1940), utilizando soluciones de etanol y xileno. Finalmente, los tejidos infiltrados fueron incluidos en cera de parafina altamente purificada mezclada con aditivos poliméricos de marca comercial Histowax. A partir de ellos se obtuvieron una serie de secciones transversales utilizando un micrótopo rotatorio (Minot). Las secciones fueron colocadas

sobre los portaobjetos y teñidas con hematoxilina, safranina O y *Fastgreen* FCF. Finalmente, los preparados histológicos fueron observados con un microscopio estándar Zeiss Modelo 16 y las microfotografías fueron tomadas con un microscopio Zeiss Axiophot acoplado a una cámara Axio CamHRc. Se utilizó el software Axio Vision 4.3 para la captura y digitalización de las mismas.

3.7. Caracterización de efluentes de curtiembre y remediación de materia orgánica empleando *L. minuta* Kunth

3.7.1. Determinación de parámetros físico-químicos del efluente

Los efluentes fueron provistos por la curtiembre Víctor M. Zabala (S.A.) de la localidad de Elena (Córdoba). Previo a los ensayos de remoción se analizaron algunas características físico-químicas del efluente tales como: pH, temperatura, color, olor, sólidos totales en suspensión (STS), contenido de fenoles totales, Cr y demanda química de oxígeno (DQO). La DQO es un parámetro indicativo del oxígeno disuelto requerido para oxidar la materia orgánica presente en una muestra mediante un agente químico, indicando la cantidad de materia orgánica total (biodegradable y no biodegradable).

Las determinaciones de pH y temperatura fueron realizadas mediante un equipo Waterproof Tester, modelo HI 98/29 y HI 98130. Para la determinación de los STS se filtraron 50 mL de efluente utilizando papel de filtro el cual fue posteriormente secado en estufa a 60 °C hasta peso constante. Los sólidos fueron determinados a partir de la diferencia de peso (g) final e inicial. La determinación se expresó en gramos de partículas suspendidas por litro de muestra de efluente. La determinación de fenol se realizó por el método descrito por Wagner y Nicell (2002) y el Cr total por Espectrofotometría de adsorción Atómica, realizado por un laboratorio especializado (FARESTAIE).

Para medir la DQO se utilizaron 200 µL de muestra que fueron colocados en los viales comerciales correspondientes (“*Digestion solution for COD High range*” marca HACH) siguiendo el método sugerido por la US EPA, cuyo fundamento se basa en la capacidad de los compuestos orgánicos oxidables de reducir el ión dicromato a ión crómico, el cual es cuantificado según su absorbancia a 610 nm en un espectrofotómetro Multiparamétrico Hanna (Modelo HI 83214).

3.7.2. Remediación de materia orgánica del efluente

Para analizar la capacidad de *L. minuta* Kunth de remover materia orgánica de un efluente de curtiembre, se inocularon las plantas (200 mg) en Erlenmeyers conteniendo 10 mL del efluente. Se observó periódicamente el aspecto de las plantas y, en aquel caso, en que el efluente fue altamente tóxico al punto de impedir el normal desarrollo de las mismas, se utilizaron estrategias de dilución del efluente con agua corriente y/o ajuste de pH cercano a la neutralidad. Las plantas fueron inoculadas en efluente puro, diluido 1/2, con o sin ajuste de pH (pH 7). Los distintos tratamientos se incubaron en cámara de plantas con temperatura controlada (25 °C, 75 rpm) y con condiciones de fotoperíodo, tal cual lo indicado anteriormente. Se realizaron controles sin planta para evaluar el efecto de la comunidad microbiana nativa del efluente sobre la remediación del mismo. Al cabo de 6 días se determinaron los valores de DQO de los distintos ensayos.

3.8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en cada experiencia se analizaron con el software estadístico R (versión i386 3.2.2). Los resultados de los ensayos de efecto del contaminante sobre la producción de biomasa y la eficiencia de remoción de materia orgánica del efluente, se analizaron utilizando la prueba de Dunnett, comparando cada tratamiento con el control.

Los ensayos de remoción de fenol a diferentes tiempos y medidas de actividad peroxidasa, se analizaron empleando el Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba Tuckey-HSD para las comparaciones múltiples.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Remoción de fenol por plantas de *L. minuta* Kunth y efecto del contaminante sobre la biomasa

4.1.1. Remoción de fenol a distintos tiempos

Los ensayos de remoción de fenol empleando la especie *L. minuta* Kunth fueron realizados en medio líquido Hoagland (diluído 1/2), pH 7. Los resultados obtenidos de la remoción de diferentes concentraciones de fenol y a diferentes tiempos se pueden observar en la Figura 10. A tiempos cortos (3 y 6 h) la remoción de fenol fue baja, alcanzando valores no superiores al 12%, tanto para 100 mg/L como para 200 mg/L. A los 2 días la remoción fue en aumento, sin embargo, no superó el 20%. Cuando la remoción se prolongó durante 5 días se pudo observar que la misma fue del 100% para ambas concentraciones de fenol.

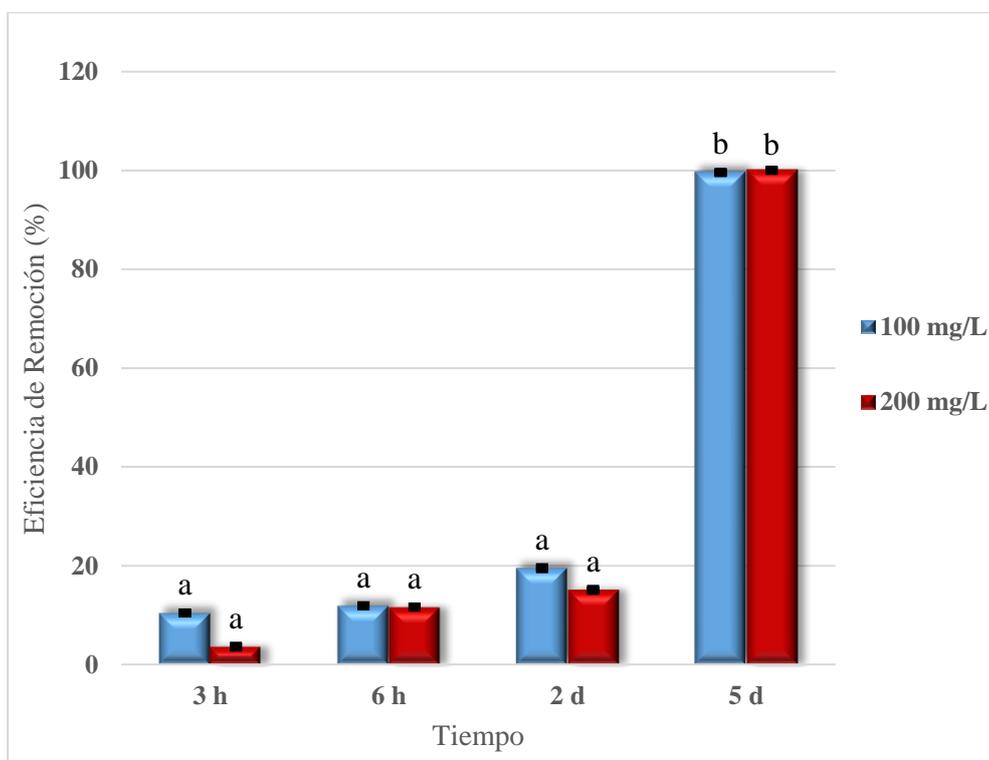


Figura 10. Eficiencia de remoción de fenol por *L. minuta* Kunth a diferentes tiempos (3 y 6 h) y días (2 y 5 días). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

De manera similar, Singh y col. (2008) han reportado remoción total de 100 mg/L y 89% de remoción para 200 mg/L de fenol en un periodo de 4 días, empleando plántulas de *Chrysopogon zizanioides* (anteriormente clasificada como *Vetiveria zizanioides*), una gramínea perenne. Así también, cultivos asépticos de *L. minor* removieron el 50% de una solución de 100 mg/L de fenol en 5 días (Radulovic y col., 2019). En este sentido, también se ha reportado que el comúnmente denominado jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) removió 99% de fenol de una concentración inicial de 10 mg/L, pero en un periodo de 14 días (Gupta y Balomajumder, 2015). Por otro lado, la especie acuática denominada *Typha latifolia* logró una remoción de otro contaminante fenólico (2,4-DCP) del 99,7% después de 4 días, cuando la concentración inicial del contaminante fue 3 mg/L, mientras que para concentraciones de 100 y 300 mg/L de 2,4-DCP los porcentajes de remoción fueron de 42 y 35%, respectivamente, al término de 10 días (Rodríguez-Hernández y col., 2017).

Diversos autores han logrado eficiente remoción de fenol empleando otros sistemas vegetales, tales como cultivos de raíces transformadas (Sosa Alderete y col., 2009; Talano y col., 2010; González y col., 2013). En este sentido, investigadores mostraron remoción del 100% y 97% para concentraciones de fenol de 100 mg/L y 200 mg/L respectivamente, luego de 3 días empleando cultivos de raíces transformadas de *Brassica juncea* (Majumder y Jha, 2012). Jha y col. (2013), por su parte, utilizando raíces transformadas de *Helianthus annuus*, obtuvieron remoción total para la concentración de 100 mg/L y 97,5% para 200 mg/L de fenol a los 6 días de tratamiento.

Con estos datos se deduce que existe una disminución en la capacidad de eliminación del fenol por parte de las plantas a medida que aumenta la concentración del contaminante y, que la eficiencia de remoción está ligada a la especie vegetal.

Las concentraciones de fenol utilizadas en el presente trabajo fueron de 100 y 200 mg/L, ya que se han reportado concentraciones en el mismo orden de magnitud en lugares contaminados y en efluentes industriales, pudiendo variar hasta valores tan altos como 1000 mg/L con gran potencial de toxicidad para animales y plantas (Paisio y col., 2009). Sin embargo, estos valores exceden ampliamente los valores de niveles de fenoles totales detectados en los efluentes de la curtiembre en estudio (hasta 17,5 mg/L) (Paisio y col., 2012).

En relación al efecto del fenol sobre la producción de biomasa de las plantas, ésta se determinó a tiempo final del ensayo (5 días), tiempo en el cual la remoción del contaminante fue total para las dos concentraciones ensayadas (100 mg/L y 200 mg/L) (Figura 11).

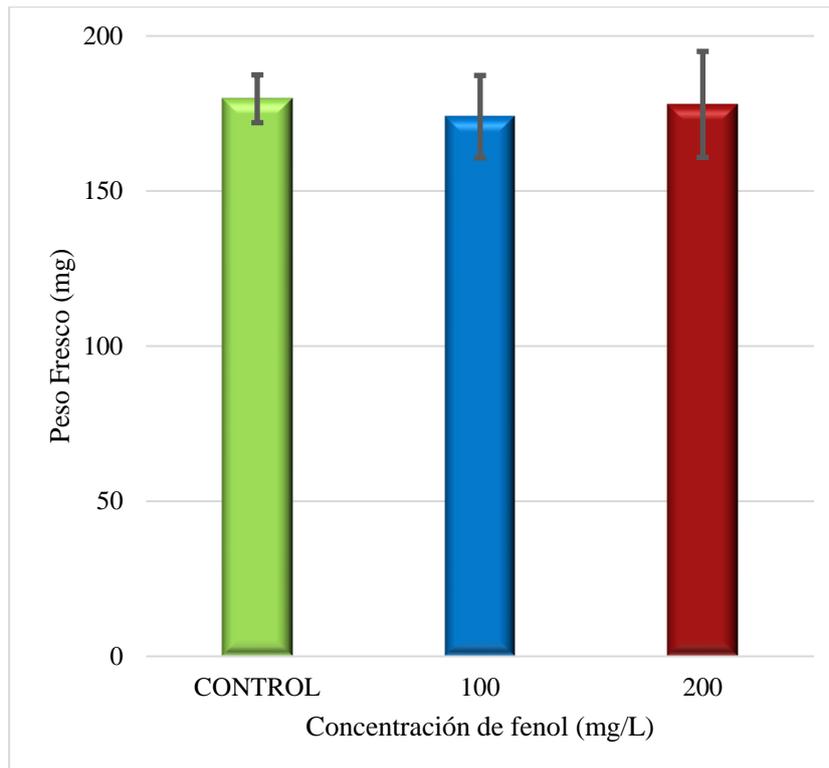


Figura 11. Efecto del contaminante sobre la producción de biomasa a los 5 días de ensayo.

Los resultados de la Figura 11 muestran que, luego de 5 días, no se observaron diferencias significativas en la biomasa de plantas de los diferentes tratamientos con respecto al control. Tampoco se observaron cambios entre los tratamientos con fenol, indicando que luego de este tiempo de exposición no se evidenciaron efectos tóxicos del fenol sobre *L. minuta* Kunth, ya que las plantas mantuvieron su color verde característico y no se vieron afectadas otras características macroscópicas. Estos resultados pueden relacionarse con la remoción de fenol observada, sugiriendo que no sería tóxico en estas concentraciones, o que tal vez estaría siendo metabolizado por las plantas. De manera similar, raíces transformadas de *Brassica napus* toleraron concentraciones de hasta 50 mg/L de fenol sin afectar su crecimiento con respecto al control (Coniglio y col., 2008).

Contrariamente a lo observado en nuestro trabajo, otros autores reportaron que la especie *L. minor* disminuyó su tasa de crecimiento relativa al aumentarse la concentración de fenol observándose que, a concentraciones superiores a 20 mg/L, la reducción de crecimiento fue significativa (Radulovic y col., 2019). En otra especie de plantas, *Typha latifolia*, los autores observaron una disminución del crecimiento cuando las mismas fueron expuestas a concentraciones mayores de 50 mg/L pero de 2,4-DCP (Rodríguez-Hernández y col., 2017).

4.1.2. Ensayos de reutilización de plantas para ensayos consecutivos de remoción de fenol

Dado que, desde el punto de vista práctico la implementación de un esquema de fitorremediación presupone la reutilización del material vegetal, se decidió evaluar la posibilidad de que las plantas sean reutilizadas en reiterados ciclos de remoción, durante un período de 30 días. En la Figura 12 (A y B) se visualizan los resultados correspondientes a los diferentes ciclos de remoción y el PF obtenido de las plantas, respectivamente.

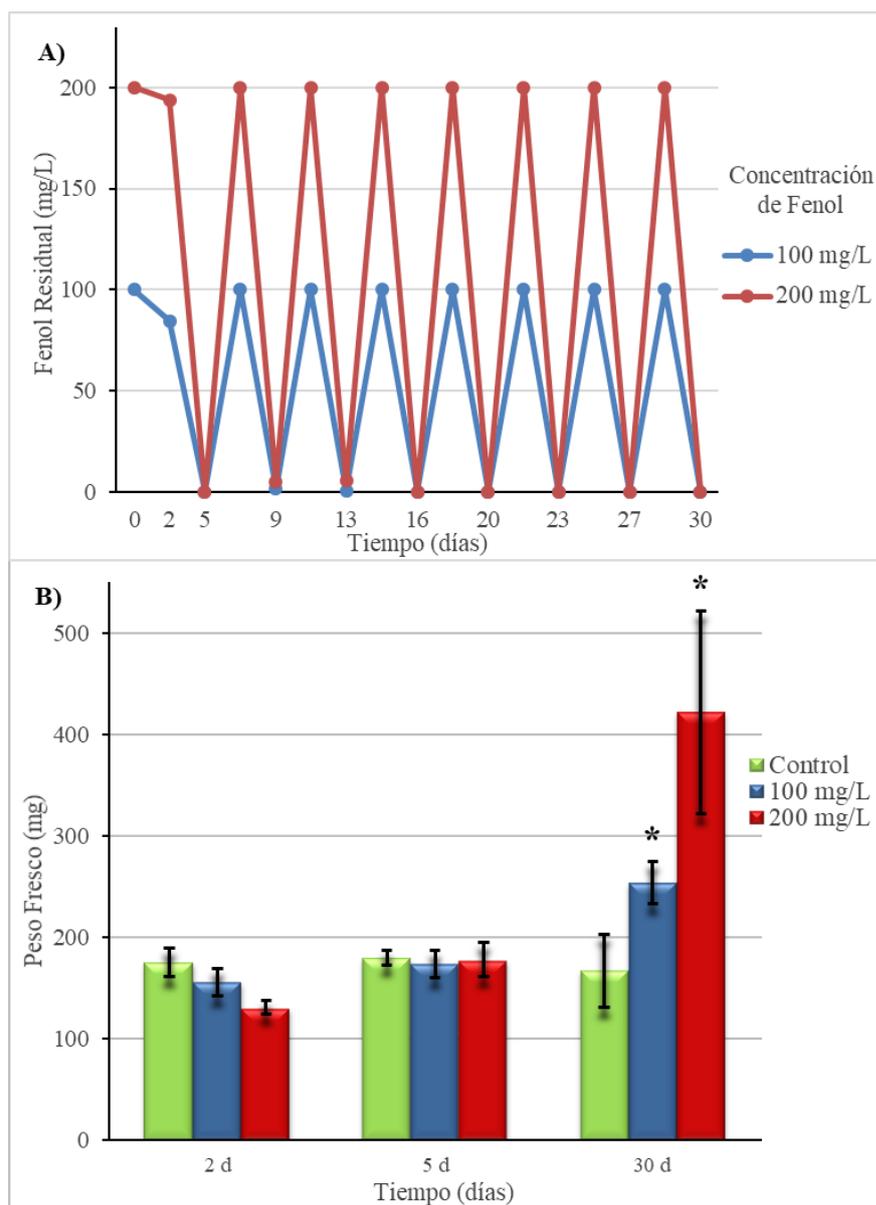


Figura 12. Ciclos de remoción de fenol y peso fresco de las plantas A) Fenol residual de ensayos de remoción de fenol (100 y 200 mg/L) en ciclos consecutivos de reciclado de plantas (3-4 días); B) Biomasa de las plantas a los 2, 5 y 30 días de exposición a fenol. * Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

Como se puede observar (Figura 12 A), las plantas fueron capaces de remover el 100% de fenol, tanto de aquellas soluciones conteniendo 100 mg/L como aquellas con 200 mg/L, durante 8 ciclos consecutivos, cada uno de ellos evaluado al término de 3-4 días. La eficiencia de remoción del 100% se mantuvo hasta el final del experimento (30 días).

Estudios presentados por Singh y col. (2008) investigando la reutilización de plántulas *in vivo* de una gramínea perenne (*Chrysopogon zizanioides*) durante 6 ciclos (30 días), en donde se renovó el medio cada 5 días con 200 mg/L de fenol, se observó que las plantas fueron capaces de conservar la eficiencia para la eliminación completa de fenol en cada ciclo. Por el contrario, estudios realizados con raíces transformadas de girasol (*Helianthus annuus* L.), mostraron que la remoción de 100 mg/L de fenol decreció de 99% en el primer ciclo (6 días) a 28% en el cuarto ciclo de reutilización (Jha y col., 2013), siendo estos resultados similares a los reportados por Singh y col. (2006), Agostini y col. (2003) y Coniglio y col. (2008), empleando raíces transformadas de las especies *Brassica juncea* y *Brassica napus*.

El análisis de la capacidad de reutilización de *L. minuta* Kunth en varios ciclos de remoción es importante para la futura aplicación industrial de esta tecnología. Con este ensayo se logró demostrar la aptitud que tiene el sistema de regenerarse y continuar removiendo el contaminante del medio en su totalidad, presentando un resultado promisorio que podría significar una ventaja económica y ecológica efectiva para ser aplicada en largos periodos de tiempo en el tratamiento de aguas residuales.

En relación con la biomasa de plantas obtenida en ensayos consecutivos de remoción de fenol (Figura 12 B) fue posible observar un incremento significativo de la biomasa con respecto al control al finalizar el experimento, tanto para 100 mg/L de fenol como para 200 mg/L. Este efecto fue más notorio para los tratamientos con 200 mg/L, a tiempo final del ensayo (30 días). Sin embargo, este efecto no fue observado a los 5 días de tratamiento, donde la biomasa obtenida fue similar al control (Figura 11). De manera similar, Singh y col. (2008), mostraron que el crecimiento de las plántulas de *Chrysopogon zizanioides* registrado como peso fresco no mostró diferencias respecto de plantas tratadas con fenol luego del primer ciclo de tratamiento (5 días) pero por el contrario a nuestros resultados el mismo se mantuvo constante al finalizar los ciclos de remoción (30 días).

Como se puede observar la biomasa final obtenida después de la exposición a fenol es variable. En este sentido, Chandra y Yadav (2010) reportaron que utilizando plantas de *Typha angustifolia* (especie perenne, herbácea y que crece en humedales) obtuvieron un crecimiento similar al control cuando las plantas fueron expuestas a una concentración de

100 mg/L. Sin embargo, la biomasa fue incrementándose a medida que aumentó la concentración de fenol, de manera similar a lo encontrado en nuestro trabajo.

Se podría sugerir que, tanto en el presente trabajo como en el mencionado anteriormente, donde se vio un aumento de biomasa por exposición a fenol, este contaminante podría ser utilizado como fuente de carbono y energía a través de una vía de degradación de fenol, posiblemente similar a la vía de degradación en bacterias (Dhir, 2013; Paisio y col., 2018). En ese caso, se esperaría que estuvieran presentes las enzimas que catalizan la apertura del anillo fenólico mediante el metabolismo aeróbico del fenol. Entre ellas la fenol hidroxilasa que permite la incorporación de oxígeno molecular al anillo aromático, dando como resultado la dihidroxilación del grupo fenilo preexistente, la catecol 1,2-dioxigenasa y la catecol 2,3-dioxigenasa, involucradas en la escisión del anillo aromático en posición *orto* o *meta*, respectivamente, y también se esperarían encontrar productos intermediarios claves como catecol, semialdehído 2-hidroxi-mucónico y/o ácido *cis-cis* mucónico que ingresarían finalmente al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Nair y col., 2008; Paisio y col., 2013).

Sin embargo, muy pocos estudios han sido realizados sobre el metabolismo del fenol en plantas. Al respecto, Jha y col. (2013), indicaron que las raíces transformadas de *H. annuus* metabolizaron fenol mediante una ruta metabólica de escisión similar a la descrita para bacterias, ya que se encontraron compuestos intermediarios como ácido *cis-cis* mucónico y ácido fumárico, siendo productos obtenidos por escisión en posición *orto* del anillo aromático (Nair y col., 2008).

Por los resultados antes expuestos, se podría hipotetizar que plantas de *L. minuta* Kunth podrían utilizar fenol como fuente de carbono y energía, ya que después de remover eficientemente 100 y 200 mg/L de fenol por 8 ciclos consecutivos, las mismas registraron un efecto significativo de su biomasa (47% y 140%) respectivamente. Sin embargo, resulta clave demostrarlo a través de la detección de intermediarios de las vías a través de distintas técnicas analíticas que se pretende realizar a futuro.

4.1.3. Efecto del agregado de H₂O₂ exógeno sobre la remoción de fenol

Dado que ha sido reportado en muchas especies la implicancia de las peroxidasas en la polimerización del fenol contribuyendo a su remoción, se evaluó el efecto del agregado de H₂O₂ exógeno en la mezcla de remoción (Figura 13). Este es un sustrato esencial para la actividad catalítica de estas enzimas, por lo que la remoción de fenol de una solución ha sido atribuida a la acción combinada de peroxidasas y H₂O₂ (Wagner y Nicell, 2002).

Teniendo presente que es necesario determinar una concentración de H₂O₂ por debajo del rango inhibitorio para cada sistema (Nazari y col., 2007), se probaron distintas concentraciones de H₂O₂ (1, 3, 5 y 7 mM) (datos no mostrados). Se seleccionaron como óptimas las concentraciones 3 y 5 mM. Como se observa en la Figura 13, el agregado de este sustrato (3 y 5 mM) produjo un aumento de 7,2 y 13,1%, respectivamente, en la cinética de remoción respecto a las plantas control (sin agregado de H₂O₂), lo cual se evidencia como menores valores de fenol residual durante los distintos tiempos analizados, aunque no se obtuvieron diferencias significativas respecto a los controles. Coniglio y col. (2008) demostraron que las raíces transformadas de *B. napus* fueron más eficientes en la remoción de fenol mediante el agregado exógeno de H₂O₂, alcanzando un 99%, comparado con un 28% logrado sin el agregado de H₂O₂. También se ha mostrado la participación de peroxidasas y H₂O₂ en la remoción de fenol en plantas de *Chrisopogon zizanioides*, ya que la concentración de H₂O₂ detectada en el medio fue menor luego del proceso de remoción, probablemente debido a una mayor actividad peroxidasa liberada por las raíces y utilización de H₂O₂ como sustrato (Phenrat y col., 2017).

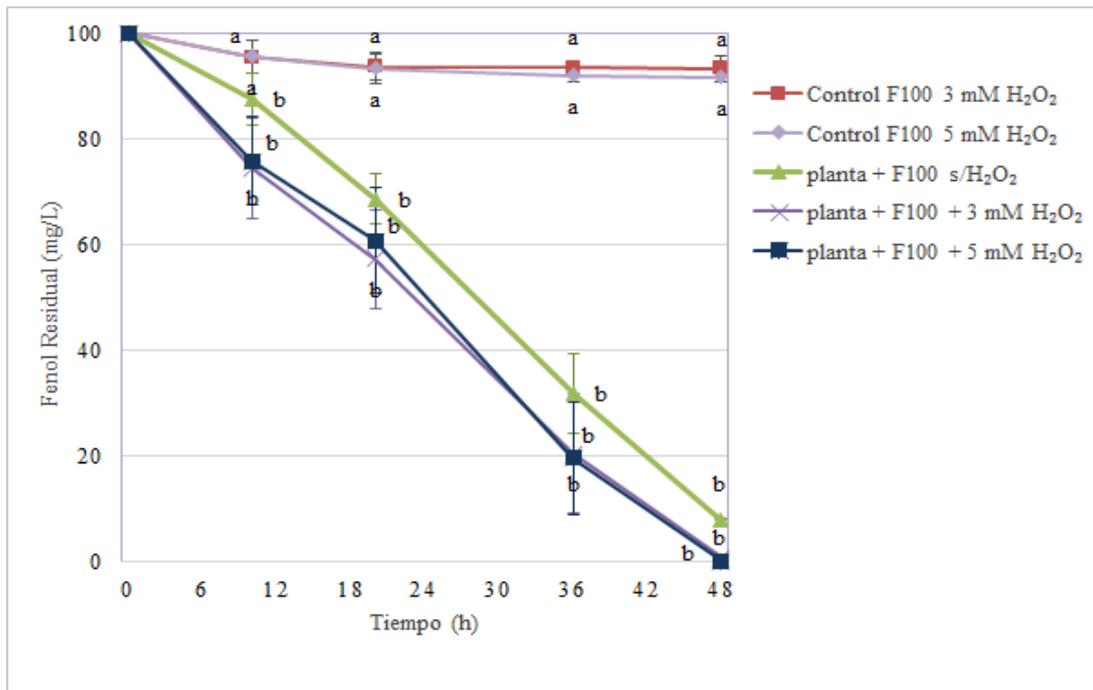


Figura 13. Fenol residual de ensayos durante 48 horas con agregado de H₂O₂ exógeno en la mezcla de remoción. F100: fenol 100 mg/L, s/H₂O₂: sin H₂O₂. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Son frecuentes los estudios de optimización de la reacción de remoción de fenol que incluyen cambios en la concentración de H₂O₂ (Hejri y Saboora, 2009). Sin embargo, el agregado de concentraciones de H₂O₂ por encima del valor óptimo, ha mostrado inhibición de la reacción de remoción (Coniglio y col., 2008). Más aún, una alta concentración de este sustrato produce inactivación enzimática mediante la conversión de peroxidasa en una verdohemoproteína denominada P-670, la cual es una forma inactiva de la enzima. También, una alta concentración de H₂O₂ puede reducir la sensibilidad y la eficacia de las peroxidases por la formación de productos intermediarios que intervienen en la reacción de remoción.

4.2. Participación de peroxidases vegetales en el proceso de remoción de fenol

4.2.1. Cuantificación de la actividad peroxidasa en los tejidos a distintos tiempos durante el proceso de remoción

En primera instancia se consideró separar parte aérea de raíz para el análisis de actividad peroxidasa de manera independiente, sin embargo, dado el pequeño tamaño de

las plantas fue una práctica poco eficiente, muy laboriosa y con pocos rendimientos. Además, la determinación de actividad en los órganos por separado nos permitió revelar que la actividad de estas enzimas en raíz era despreciable respecto de la actividad peroxidasa hallada en parte aérea (Figura 14), por lo que en lo sucesivo se resolvió evaluar este parámetro en planta entera.

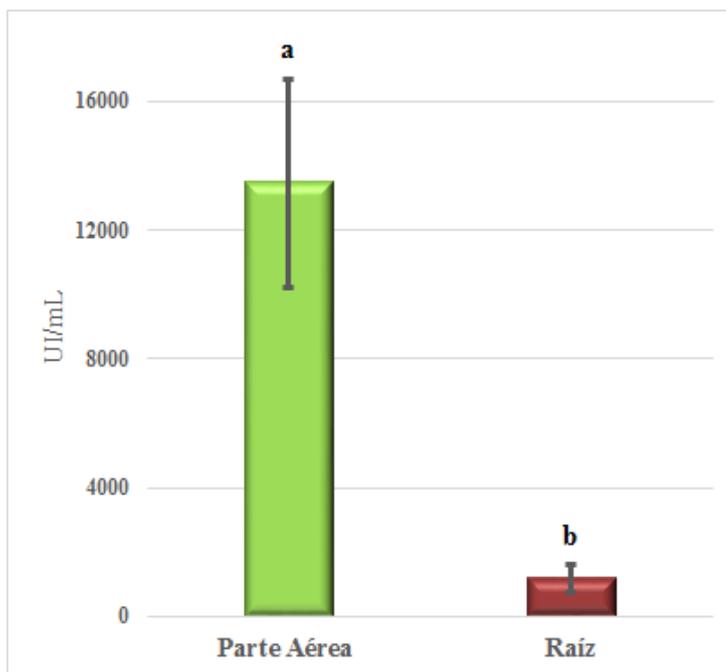


Figura 14. Medida de actividad peroxidasa en parte aérea y en raíz de *L. minuta* Kunth. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Cuando se analizó la actividad peroxidasa en plantas luego de 2 y 5 días de exposición a fenol, se observó una disminución a los 2 días de tratamiento, siendo más pronunciada para 200 mg/L, en donde se observó diferencias significativas respecto al control (Figura 15). Esta menor actividad enzimática observada a los 2 días frente a exposición a fenol, se correlaciona con la disminución de PF cuantificada en estas plantas (Figura 12 B). Sin embargo, los niveles de estas enzimas alcanzaron valores similares a las plantas control, cuando la remoción de fenol fue completa (5 días) para ambas concentraciones (100 mg/L y 200 mg/L).

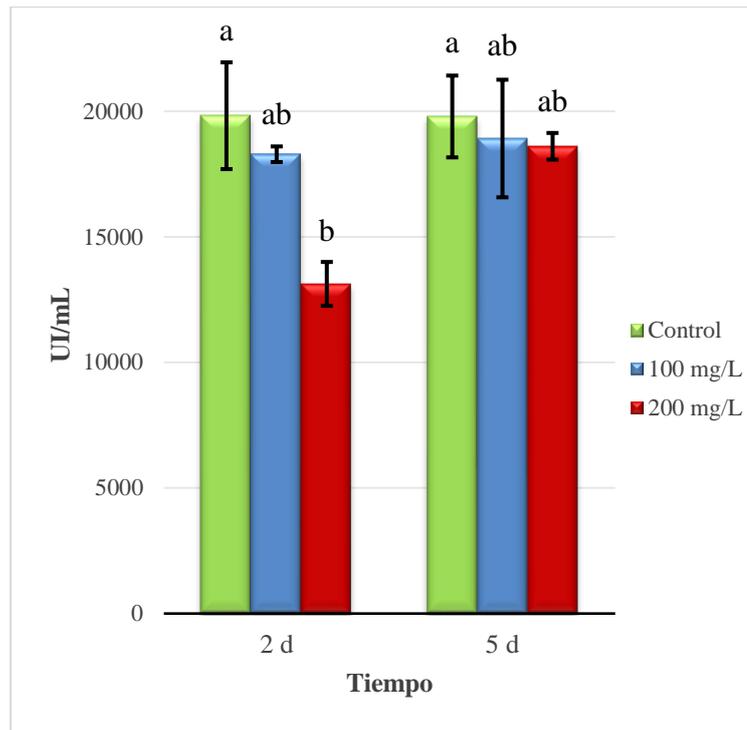


Figura 15. Actividad peroxidasa en plantas de *L. minuta* Kunth en condiciones control y expuestas a fenol (100 y 200 mg/L), luego de 2 y 5 días de tratamiento. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos ($p > 0,05$).

Con estos antecedentes, se podría sugerir una posible adaptación de las plantas e inducción de la síntesis de estas enzimas, indicando que la producción de peroxidasa ofrece un potencial para el desarrollo de un sistema de fitorremediación sostenible en el tiempo, más aún cuando el contaminante no afecta el crecimiento de las plantas.

Coniglio y col. (2008) obtuvieron resultados similares con raíces transformadas de *B. napus*, ya que la actividad peroxidasa total fue similar al control, o sólo disminuyó ligeramente en presencia de 100 mg/L de fenol.

Sin embargo, varios autores usando sistemas vegetales *in vitro* de diferentes especies, establecieron que la actividad peroxidasa puede aumentar o disminuir luego del tratamiento con contaminantes orgánicos (Araujo y col., 2002; Nepovim y col., 2004; Singh y col., 2008). Contrariamente a lo obtenido en el presente estudio, Araujo y col. (2006) demostraron que la desaparición de fenoles en el medio de cultivo, estuvo acompañado por un aumento en la actividad peroxidasa en raíces transformadas de *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* y *Solanum aviculare*.

Por otro lado, es conocido que plantas de la familia *Araceae* son capaces de liberar peroxidasa al medio de cultivo bajo condiciones normales de crecimiento a través de sus

hojas (Jansen y col., 2004). Los autores Biswas y col. (2010) detectaron en plantas de *Landoltia punctata* (antes denominada *Spirodela punctata*), *L. minor* y *L. gibba* una baja actividad peroxidasa en ausencia de contaminantes. Estos autores demostraron que la actividad peroxidasa en estas especies se encuentra cerca de la superficie abaxial de las hojas y también se liberan en el medio en el que se cultivaron las plantas. Cuando las tres especies de plantas fueron expuestas a 2,4,6-TCP, todas incrementaron su nivel de actividad peroxidasa en el medio. En *L. minor* y *L. gibba* la relación de crecimiento fue inversa, ya que cuanto menor fue la biomasa acumulada mayor fue la actividad peroxidasa. Mientras que *L. punctata* alcanzó su máxima actividad peroxidasa en concentraciones que no tuvieron un efecto importante en el crecimiento, de esta manera ésta última especie fue la más eficiente para la remoción de 2,4,6-TCP en ensayos *in vivo*, demostrando que puede ser una estrategia de estas plantas acuáticas frente al estrés causado por xenobióticos.

4.2.2. Análisis de los perfiles de isoenzimas de peroxidasas

Debido a que se ha descrito que existen varias isoenzimas de peroxidasas implicadas en la remoción de compuestos fenólicos, se estudiaron los perfiles de isoenzimas en las diferentes condiciones en plantas de *L. minuta* Kunth. Se pudo observar que esta especie vegetal presenta dos isoenzimas de peroxidasas ácidas (Figura 16 A) cuyos Rf son 0,16 y 0,83 y una isoenzima básica de Rf 0,16 crecidas en condiciones control (Figura 16 B).

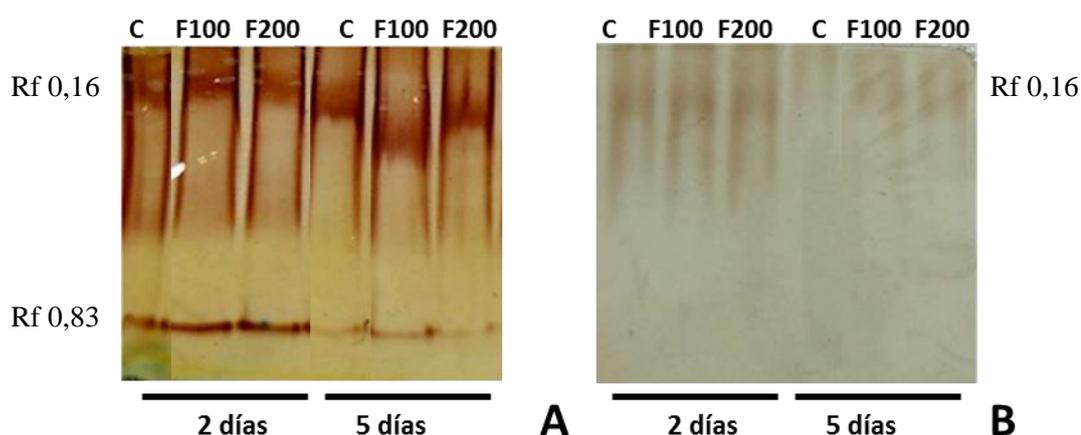


Figura 16. Perfiles de isoenzimas de peroxidasas ácidas y básicas en plantas enteras de *Lemna minuta* Kunth. Perfiles isoenzimas de plantas control (C) y tratadas con fenol (100 y 200 mg/L), durante 2 y 5 días evaluadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida aniónica (A) y catiónica (B).

El tratamiento con fenol no afectó los perfiles de isoenzimas de peroxidasas básicas y ácidas de estas plantas, comparadas con plantas control, luego de 2 y 5 días de tratamiento. Por otra parte, no se pudo evaluar la presencia de isoenzimas de peroxidasas secretadas al medio de cultivo dada su baja concentración. Contrariamente, Jansen y col. (2004) visualizaron una banda de isoenzima de peroxidasa presente en el medio de cultivo de *L. punctata*, la cual tras la exposición a 2,4,6-TCP presentó mayor intensidad, indicando una expresión enzimática regulada positivamente en respuesta al contaminante. Los autores reportaron que *L. punctata* es capaz de sentir y generar una respuesta a fenoles halogenados que implica la inducción en la síntesis de peroxidasas preexistentes, aunque no la aparición de nuevas isoenzimas.

En relación con los perfiles de isoenzimas y peroxidasas, otros estudios que evalúan otro tipo de contaminante como los metales, indican que la actividad total de peroxidasas y ascobato peroxidasas (APX) aumentaron significativamente en un 45% y un 57% en hojas de plantas de *L. minor* expuestas a aluminio en comparación con sus respectivos controles. Al contrario de los resultados mostrados en el presente estudio, en comparación con los controles, el tratamiento con metales aumentó la actividad de tres isoenzimas de peroxidasas, la actividad de dos isoenzimas disminuyó, mientras que otra mantuvo su intensidad. Además, la actividad de las tres isoenzimas APX también aumentó al ser tratadas con el contaminante (Su y col., 2019).

Por otro lado, Coniglio y col. (2008) utilizando raíces transformadas de nabo, no detectaron cambios en los perfiles de isoenzimas de peroxidasas en los extractos de las mismas expuestas a fenol, luego de un ciclo de remoción, pero sí luego de ensayos de varios ciclos de exposición, hallando tanto cambios cualitativos como cuantitativos. En este caso, después de ensayos consecutivos de remoción de fenol, las isoenzimas básicas y neutras fueron inhibidas mientras que las isoenzimas ácidas no fueron afectadas, sugiriendo que sólo algunas isoenzimas de peroxidasas son las responsables de la remoción de fenol. Los autores sugirieron que probablemente las isoenzimas ácidas son más resistentes a la inactivación por H₂O₂.

A pesar de que poco se conoce sobre la asociación de isoenzimas de peroxidasas sobre procesos fisiológicos específicos, los niveles de muchas isoenzimas de peroxidasas están positivamente regulados en respuesta a estrés (Welinder y col., 2002, Jansen y col., 2004). De hecho, se cree que las peroxidasas participarían en la aclimatación de las plantas a estrés ambiental biótico (Bolwell y col., 2002) y abiótico (Jansen y col., 2001). Incluso, otros autores han sugerido que las peroxidasas son responsables de la transformación de

xenobióticos en plantas, pero la información sobre cuáles son las isoenzimas involucradas, es escasa (Nepovim y col., 2004, Araujo y col., 2006, Mackova y col., 2006).

4.2.3. Análisis morfológico de raíces y parte aérea de *L. minuta* Kunth tratadas con fenol

4.2.3.1. Análisis macroscópico de raíces y parte aérea bajo tinciones específicas

La tinción con fluoroglucinol-HCl (F-HCl) permite poner en evidencia polímeros tipo lignina y suberina con una característica coloración rojiza. Las plantas tratadas con fenol 100 mg/L presentaron coloración rojiza (Figuras 17, C y D) y más aún aquellas tratadas con fenol 200 mg/L (Figuras 17, E y F). Estas últimas se observaron con mayor coloración en sus hojas, tejido que queda enteramente en contacto con fenol, y que se correlaciona con los datos donde hubo mayor diferencia de actividad peroxidasa entre los 2 y 5 días de tratamiento y mayor biomasa luego de 30 días de tratamiento, con respecto a plantas tratadas con fenol 100 mg/L. Se podría sugerir que este tejido foliar estaría más ligno-suberizado que aquellas plantas control (Figura 17 B), de manera similar al control positivo utilizado, el cual corresponde a raíces transformadas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) en etapa de senescencia, y que presentan un alto grado de lignificación (Figura 17 A). Este proceso se podría explicar por la capacidad que tienen las plantas de polimerizar el fenol y luego, compartimentalizar estos polímeros resultantes en una fracción de residuos “ligada” a las paredes celulares de las plantas (Talano y col., 2010).

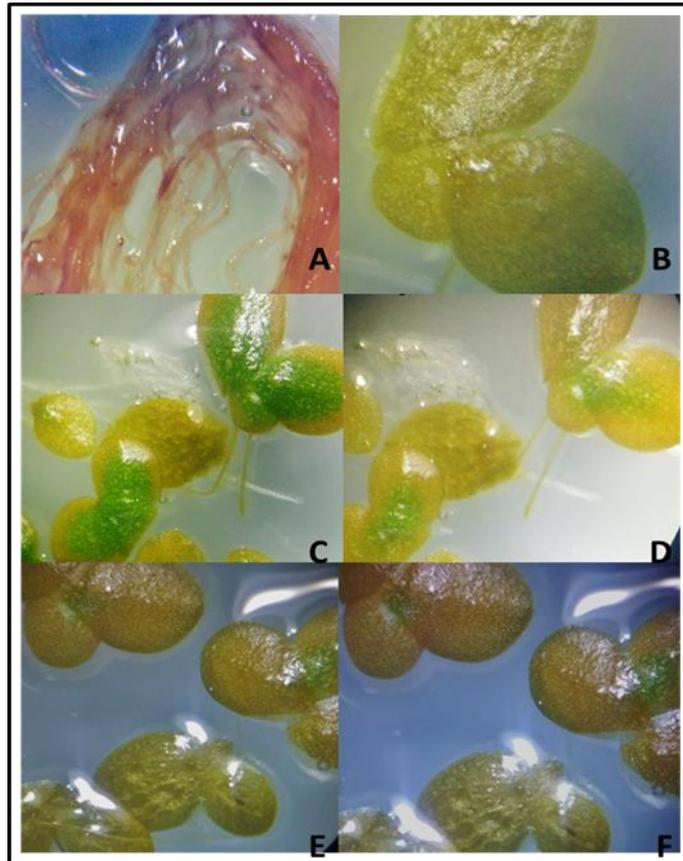


Figura 17. Imágenes obtenidas con lupa (10X) de órganos vegetales teñidos con F-HCl. Raíces transformadas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) usado como control (A), parte aérea de *L. minuta* Kunth control (B), tratadas con 100 mg/L de fenol (C y D) y tratadas con 200 mg/L de fenol (E y F).

De manera similar, Jansen y col. (2001) realizaron experimentos con *L. gibba*, en los cuales el ensayo con F-HCl reveló deposición de lignina en las paredes de las células del mesófilo asociado a un aumento de actividad peroxidasa en respuesta a estrés abiótico.

Por lo mencionado anteriormente, se podría especular que los resultados obtenidos en nuestro trabajo en *L. minuta* Kunth, podrían deberse a una respuesta a estrés por fenol induciendo una mayor lignificación en los tejidos foliares de estas plantas.

4.2.3.2. Análisis estructural de raíces

Se analizaron los cambios de estructura en raíces de *L. minuta* Kunth expuestas a fenol. En la Figura 18 se observan las imágenes de los cortes transversales realizados en las raíces, en las cuales se pudo observar en condiciones control (Figura 18 A), una capa de epidermis formada por células irregulares de paredes delgadas, donde no se evidenció

cutícula sobre su pared tangencial externa. Hacia el interior del órgano se encuentra la corteza, formada por 3 ó 4 capas de parénquima. Las células de las capas más externas son voluminosas, de formas diversas, ricas en cloroplastos y algunos plastidios y se disponen dejando evidentes espacios intercelulares que facilitan el intercambio gaseoso con el medio. La capa más interna de la corteza está formada por células pequeñas, uniformes, que no dejan espacios intercelulares y envuelve los escasos elementos conductores presentes que se ubican en posición central. Esta capa guarda cierta similitud con una endodermis, pero no se observaron bandas de Caspary (Figura 18 A).

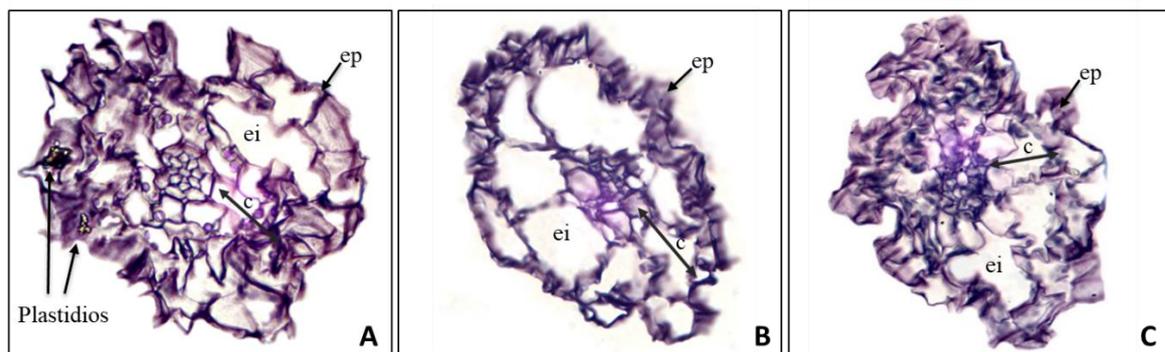


Figura 18. Cortes transversales de tejido de raíz incluido en parafina de plantas de *L. minuta* Kunth en condiciones control (A) y tratadas con 100 mg/L de fenol (B) y 200 mg/L de fenol (C) observadas en microscopio con aumento 40X. (ep: epidermis, c: corteza, ei: espacio intercelular).

Cuando se analizaron las raíces tratadas con fenol, éstas presentaron un diámetro menor, una reducción en el contenido de plastidios en las células corticales y en el área ocupada por los elementos conductores centrales, respecto a las raíces crecidas en condiciones control (Figura 18, B y C). Raíces de *T. angustifolia*, al ser expuestas a contaminantes orgánicos e inorgánicos (fenol y metales pesados) también mostraron cambios morfológicos en los tejidos de las plantas (Chandra y Yadav, 2010). En este caso, las raíces presentaron ruptura de células del parénquima en comparación con el control, como así también, una reducción del tamaño celular y de los núcleos junto a la formación de espacios intercelulares. Estos autores justificaron la reducción del tamaño del núcleo de las células y la forma cuadrangular alargada de las células del parénquima, por una baja tolerancia de la planta a estos compuestos tóxicos (Chandra y Yadav, 2010). También en otra especie vegetal (*B. juncea*), de manera similar a lo observado en células de raíz de *L. minuta* Kunth, se encontró ruptura de las células del parénquima esponjoso y de células del

parénquima en empalizada, acompañado de cambios y/o pérdida en la forma de las células debido a lignificaciones frente a tratamientos con Zn y Cd (Sridhar y col., 2005).

Varios autores han descrito engrosamientos de polímeros tipo lignina posiblemente correspondientes a la polimerización de fenol cuya estructura química es similar a los sustratos naturales de peroxidasas, y/o formación de gruesas bandas de Caspary que afectan el flujo apoplástico de solutos como respuesta de defensa a la toxicidad del fenol. Si bien, la mayoría de las especies de lenteja de agua como *L. minuta* Kunth presentan bajos contenidos de lignina (Landolt y Kandeler, 1987), existe la posibilidad de que acumulen lignina y/u otros polímeros fenólicos tal como algunas macrófitas que contienen una elevada actividad peroxidasa (Jansen y col., 2001).

4.3. Evaluación del potencial de *L. minuta* Kunth para la remediación de materia orgánica de efluentes de curtiembre

En estudios previos nuestro grupo de trabajo determinó la capacidad de esta especie vegetal para remediar Cr (VI) y fenol de manera simultánea en soluciones sintéticas con alta eficiencia (Paisio y col., 2018). Por esta razón, resulta de interés analizar el potencial de estas plantas para tolerar y crecer en aguas residuales o efluentes, a fines de ser utilizadas como herramientas biotecnológicas para lograr su remediación. Para ello, se utilizó efluente de curtiembre, ya que los mismos poseen generalmente elevadas concentraciones de materia orgánica como así también Cr y fenol.

4.3.1. Caracterización físico-química del efluente

Las muestras de efluente pertenecientes a la curtiembre Víctor Manuel Zabala S.A. fueron tomadas en diferentes períodos estacionales a fines de realizar una caracterización del efluente y comparar los parámetros físico-químicos obtenidos con los estándares reglamentarios (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros físico-químicos del efluente

Parámetro	Valores obtenidos (rango)	Valores permitidos (*)
pH	7,8-9,8	6-9
Color	grisáceo-verdoso	--
Olor	pútrido	--
Sólidos disueltos totales (SDT) (mg/L)	0,02-7,8	$< 4 \times 10^7$
DQO (mg/L)	1.300-3500	< 250
Fenol (mg/L)	1-14	$\leq 0,05$
Cr total (mg/L)	0,2-10	≤ 1

*según anexo único de la reglamentación de estándares y normas sobre vertidos para la preservación del recurso hídrico provincial Córdoba (2016) (web2.cba.gov.ar).

Como puede observarse los valores de DQO, fenol y Cr total superaron los límites establecidos para efluentes líquidos que pueden ser vertidos a cuerpos de aguas superficiales de la provincia de Córdoba. Con respecto a esto, los valores elevados de DQO indican un gran contenido de materia orgánica, sumado a los elevados contenidos de Cr y fenol. Por esta razón, consideramos de gran importancia analizar si esta macrófita acuática podría ser capaz de remover la materia orgánica presente en estos efluentes.

4.3.2. Remediación de materia orgánica del efluente

En primera instancia se analizó el crecimiento de las plantas en el efluente puro, observándose que las mismas fueron incapaces de sobrevivir en el mismo al término de 24 h (Figura 19 A). Por este motivo, dada la alta toxicidad del efluente puro para las plantas de *L. minuta* Kunth, se emplearon dos estrategias para lograr que las plantas pudieran sobrevivir y así remediar la materia orgánica presente en el efluente. Una de ellas fue la dilución del efluente con agua corriente (1/2, 1/5 y 1/10) y, por otro lado, se hizo un ajuste de pH llevándolo de 9,8 a la neutralidad (pH 7).

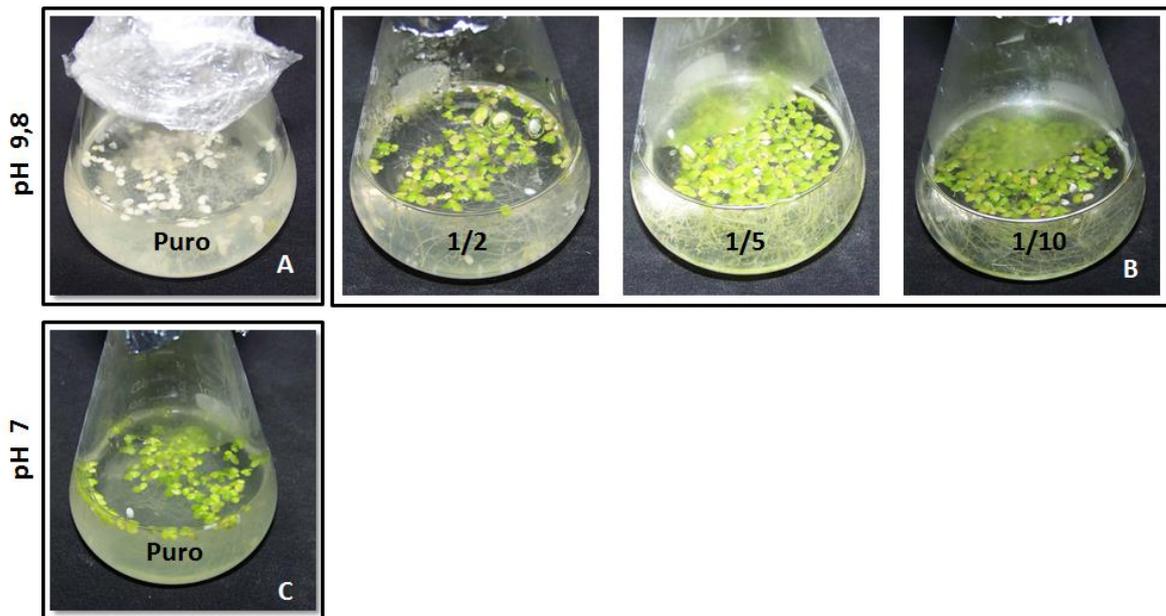


Figura 19. Crecimiento de *L. minuta* Kunth en efluentes de curtiembre. Aspecto de las plantas luego de 24 h de exposición al efluente puro (A). Aspecto de las plantas luego de 6 días de exposición a: efluente puro (pH 9,8) diluido (1/2, 1/5, 1/10) (B) y efluente con ajuste a pH 7 (C).

Como resultado, se observó que las plantas pudieron sobrevivir en el efluente puro cuando se ajustó el pH a 7 y se mantuvieron verdes hasta finalizar el experimento (6 días). Además, la estrategia de dilución hizo posible la sobrevivencia de las plantas y, como era de esperar, se observó que mientras mayor fue la dilución, mayor fue el crecimiento de las mismas (Figura 19 B). De manera similar, plantas de *Chrysopogon zizanioides* L., presentaron mayor incremento de biomasa cuando fueron expuestas a un efluente diluido de aceite de palma (Darajeh y col., 2014). Sin embargo, Phenrat y col. (2017) cuando expusieron la misma especie de planta a un efluente industrial conteniendo fenol, observaron que el crecimiento de las plántulas se vio afectado, el peso de la parte aérea y raíces decreció de manera exponencial, las hojas se volvieron oscuras y consecuentemente, se cayeron.

Una vez determinadas las condiciones en las cuales las plantas fueron capaces de sobrevivir, se evaluó la remediación de materia orgánica en efluente diluido 1/2 y en efluente puro con ajuste de pH a 7. Para ello, las plantas fueron probadas en las distintas condiciones y a los 6 días de incubación se determinó la DQO para determinar la remoción de materia orgánica. Los resultados se muestran en la Figura 20 A. En simultáneo, se realizaron controles sin plantas para analizar la contribución de la comunidad microbiana nativa del efluente en la remoción.

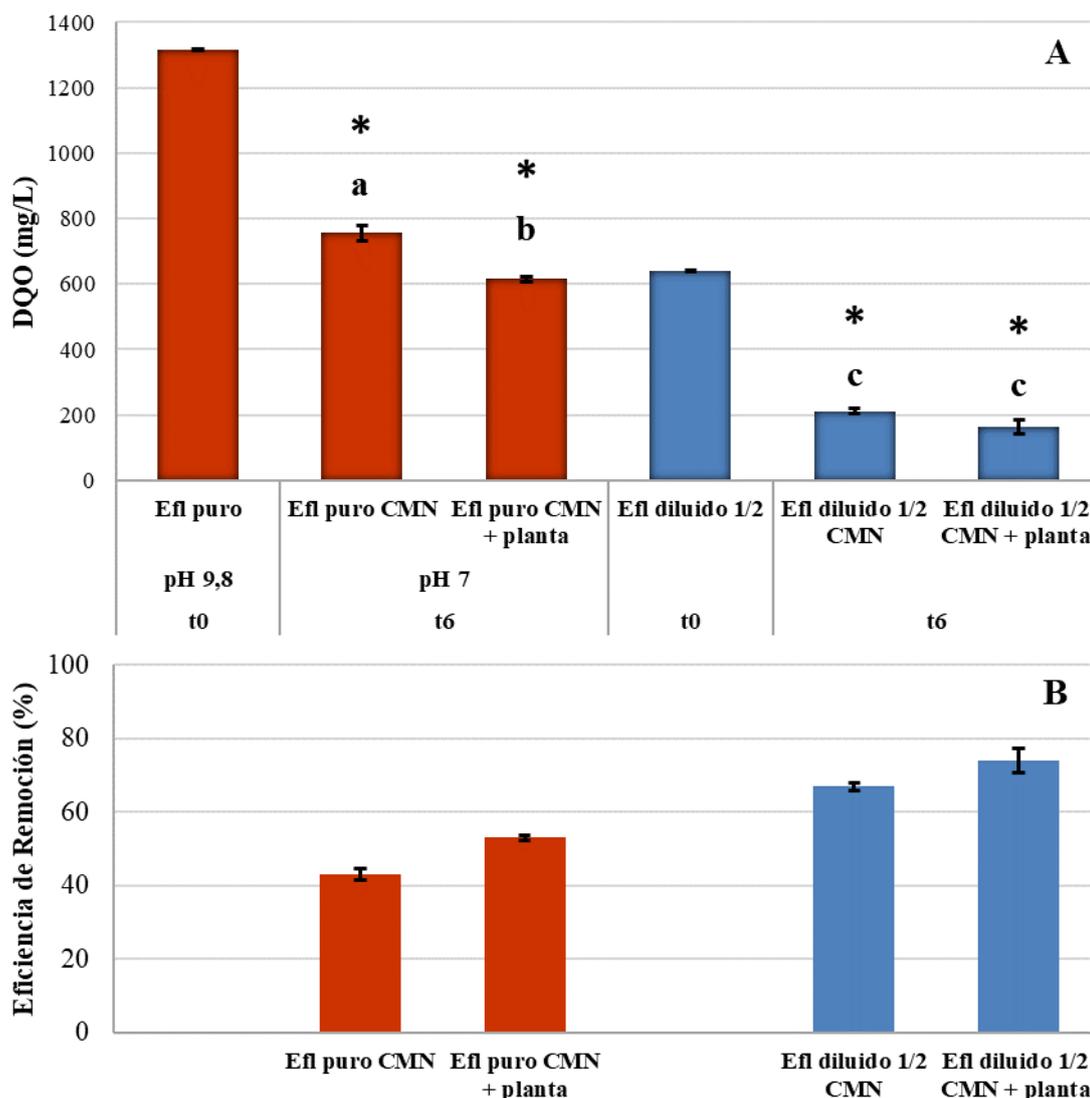


Figura 20. Valores de DQO de efluente de curtiembre y eficiencia de remoción de materia orgánica empleando plantas de *L. minuta* Kunth. A) Valores de DQO de efluente puro con ajuste de pH y diluido luego de 6 días (t6). B) Eficiencia de remoción de materia orgánica. Efl: Efluente CMN: Comunidad microbiana nativa * Indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a su respectivo control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones ensayadas ($p < 0,05$).

Como se puede observar en la Figura 20 A, cuando el efluente fue llevado a pH 7 y al cabo de 6 días, los valores de DQO disminuyeron de 1315 a 755,3 mg/L, lográndose una eficiencia de remediación del 43%, lo cual es atribuido a la presencia de la comunidad microbiana nativa propia del efluente. Cuando el efluente en estas condiciones fue tratado con *L. minuta* Kunth se observó un valor menor de DQO, obteniéndose un 10% adicional de la eficiencia de remediación (Figura 20 B) en donde se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones ensayadas. De los resultados obtenidos utilizando la estrategia de dilución del efluente, se pudo observar que la DQO se

redujo a un 33% (de 640 a 211 mg/L) en ausencia de la planta, lo que implica una eficiencia de remediación del 67% con la comunidad microbiana nativa, mientras que la eficiencia de remediación fue un 7% adicional cuando el efluente fue tratado con *L. minuta* Kunth, al término de 6 días, alcanzando una eficiencia de remediación de un 74% (Figura 20 B).

Independientemente de la estrategia utilizada para favorecer la sobrevivencia de las plantas en el efluente (dilución y ajuste de pH), cuando estuvo presente *L. minuta* Kunth, ésta contribuyó con una reducción adicional de DQO respecto de los controles con la comunidad microbiana nativa propia del efluente. Debemos destacar que el contenido de materia orgánica (determinado como DQO) presente en los efluentes diluidos tratados con *L. minuta* Kunth, al término del ensayo fue de 163 mg/L. Esto es de gran importancia considerando que este valor de DQO estaría por debajo de los valores permitidos por la legislación provincial (Tabla 3) para efluentes que pueden ser liberados a cursos de aguas naturales, la cual establece un valor menor a 250 mg/L.

Los menores valores de DQO alcanzados mediante el proceso de fitorremediación indicarían un potencial importante de estas plantas, en combinación con la comunidad microbiana nativa del efluente, para la remediación de materia orgánica. En este sentido, Dipu y col. (2011) seleccionaron 6 especies de macrófitas acuáticas para comparar su eficiencia en el tratamiento de un efluente industrial bajo condiciones de laboratorio, entre las que se hallaba *Lemna* spp. Es importante mencionar que estos autores también usaron como estrategia la dilución del efluente para reducir su toxicidad inicial y hacer factible el tratamiento de fitorremediación, permitiendo la viabilidad de las plantas. Estos investigadores reportaron cambios significativos en la disminución de DQO, a diferencia de los resultados mostrados en el presente trabajo, ya que se obtuvo un 68% de reducción para el efluente diluido a la mitad y 72% para el efluente sin dilución, mientras que, la DQO de los controles disminuyó en un 35% con respecto a los valores iniciales. También, estos autores demostraron cambios significativos en la reducción de la turbidez del efluente, comparable al presente estudio, ya que el efluente de curtiembre se tornó prácticamente transparente con la presencia de plantas de *L. minuta* Kunth.

Además, se ha reportado la remediación de otros tipos de efluentes como los derivados de la industria del aceite de palma, empleando plantas de *Chrysopogon zizanioides* L. (Darajeh y col., 2014). Estos autores destacaron que la remediación del efluente es dependiente de la concentración inicial de materia orgánica presente. Altas concentraciones de materia orgánica resultan tóxicas para las plantas, las cuáles

generalmente se utilizan como proceso terciario de remediación, posteriormente a la remoción biológica con microorganismos la cual es utilizada como proceso secundario.

Dipu y col. (2011) mencionan que la reducción en los valores de DQO empleando plantas acuáticas está relacionado con la característica única de transportar oxígeno de las partes aéreas a las partes sumergidas, de manera tal, que el oxígeno transportado aumentaría significativamente el contenido de oxígeno en el medio líquido, esencial para que se lleven a cabo procesos oxidativos sobre la materia orgánica presente. También existiría la posibilidad de que la transferencia de oxígeno en la zona de la raíz juegue un papel importante en el crecimiento de bacterias aeróbicas y posterior degradación de carbono del agua residual. Además, el alto contenido de sólidos en suspensión en las muestras de efluentes podría ayudar a mejorar la actividad microbiana como sustrato adicional en las raíces de las plantas acuáticas. Estas razones podrían explicar la eficiencia de remoción del sistema vegetal en estudio asociado a su comunidad microbiana nativa, que además presenta la ventaja de poseer un sistema de flotación libre sin restricciones en los sistemas acuáticos y éstas cubren grandes áreas para la absorción, en comparación con las plantas fijas emergentes (Kumari y Tripathi, 2014). También hay que mencionar que a mayor densidad de plantas se logra mayor eficiencia de remoción, dependiendo del tipo de efluente a tratar y de la macrófita utilizada (Darajeh y col., 2014).

5. CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones Parciales

- ❖ Las plantas de *L. minuta* Kunth fueron capaces de remover completamente fenol de soluciones sintéticas en las dos concentraciones evaluadas (100 mg/L y 200 mg/L) en un periodo de 5 días, manteniendo la turgencia y el color verde característico de sus hojas.
- ❖ Durante ciclos consecutivos de remoción de fenol (para ambas concentraciones), las plantas fueron capaces de remover el contaminante del medio en un periodo de 8 ciclos continuos con una duración total de 30 días, poniendo de manifiesto el potencial para su utilización en fitorremediación.
- ❖ El peso fresco de las plantas no se vio afectado al finalizar el proceso de remoción de fenol. Incluso, mostraron mayor peso fresco con respecto al control al concluir con los ensayos de reutilización, que se hizo más notorio cuando la concentración de fenol utilizada fue la mayor (200 mg/L), lo que podría estar dando indicio de la utilización de este compuesto orgánico como fuente de carbono.
- ❖ Dado que la actividad peroxidasa de las plantas expuestas a fenol aumentó a los 5 días coincidiendo con el alcance de la remoción completa, se sugiere que este tratamiento indujo la síntesis de estas enzimas indicando una posible adaptación de las plantas frente a este contaminante.
- ❖ El fenol no afectó los perfiles de enzimas de peroxidasas básicas y ácidas de estas plantas comparadas con plantas control, luego de 2 y 5 días de tratamiento.
- ❖ La adición de H₂O₂ produjo un ligero incremento (7,2-13,1%) en la cinética de remoción respecto a las plantas control (sin H₂O₂).

❖ La tinción con F-HCl reveló un tejido más ligno-suberizado que las plantas control, sugiriendo la participación de peroxidasas y consecuente formación de polímeros tipo lignina que se depositan sobre las paredes las células como mecanismo de remediación de fenol en plantas de *L. minuta* Kunth.

❖ Con respecto a la estructura, las raíces de *L. minuta* Kunth tratadas con fenol presentaron un diámetro menor, una reducción en el contenido de plastidios en las células corticales de la raíz y en el área ocupada por los elementos conductores centrales, respecto a las raíces sin tratar, quizás como respuesta al estrés dada la toxicidad del fenol.

❖ Las plantas pudieron sobrevivir en el efluente de curtiembre, cuando el mismo se ajustó a pH neutro y se diluyó a la mitad. En estas condiciones se logró una eficiencia de remediación de materia orgánica de un 53 y 74% para efluentes de pH 7 o diluidos a la mitad, respectivamente, siendo el aporte de *L. minuta* Kunth de 7-10% de reducción adicional de DQO respecto de los controles con la comunidad microbiana nativa.

5.2. Conclusión final

Los estudios realizados en la presente tesis permitieron comprobar y demostrar la gran capacidad de la especie autóctona de Córdoba *Lemna minuta* Kunth, para remover fenol en soluciones sintéticas, pudiendo ser útil para futuras aplicaciones biotecnológicas al poder ser reutilizadas durante varios ciclos de remoción.

El mecanismo por el cual *L. minuta* Kunth fue capaz de remover fenol, implicaría la acción de peroxidasas y la formación de polímeros tipo lignina que serían compartimentalizados con componentes de la pared celular. El aumento de biomasa de las plantas que se vio después de los tratamientos con fenol, podría ser indicativo de otros mecanismos de remoción, sumado a la polimerización y/o adsorción a la superficie que fue observada, que permitiría la utilización de fenol como fuente de carbono y energía.

Por último, es importante destacar la sobrevivencia de *L. minuta* Kunth y su capacidad para remover materia orgánica a partir de un efluente de curtiembre. Esto permitiría desarrollar a futuro estrategias alternativas para el tratamiento de ambientes acuáticos contaminados con alto contenido de materia orgánica.

Bibliografía

- Abarca M.S., Brenes M.B. 2007. Contaminación del agua. *Biocenosis*, 20: 1-2.
- Abdallah M.A.M. 2013. The potential of different bio adsorbents for removing phenol from its aqueous solution. *Environ. Monit. Assess.*, 185 (8): 6495-6503.
- Abhilash P., Jamil S., Singh N. 2009. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnol. Adv.*, 27: 474-488.
- Agarry S.E., Solomon B.O. 2008. Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous *Pseudomonas fluorescens*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 5 (2): 223-232.
- Agostini E., Coniglio M.S., Milrad S.R., Tigier H.A., Giulietti A.M. 2003. Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy roots cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37: 139-144.
- Agostini E., Talano M.A., González P.S., Wevar Oller A.L., Medina, M.I. 2011. Phytoremediation of phenolic compounds: Recent advances and perspectives. En: Golubev I.A., eds. *Handbook of Phytoremediation*. Nova Science Publishers. New York., pp. 1-50.
- Ansola G. 2003. Utilización de humedales artificiales en la depuración de aguas residuales. En: *El agua, un bien para todos. Conservación, recuperación y usos. 6as Jornadas Ambientales*. Salamanca. Ed. P. Ramos, S.A., pp. 145-170.
- Araujo B.S., Charlwood B.V., Pletsch M. 2002. Tolerance and metabolism of phenol and chloroderivatives by hairy root cultures of *Daucus carota* L. *Environ. Pollut.*, 117: 329-335.
- Araujo B.S., Dec J., Bollag J.M., Pletsch M. 2006. Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Chemosphere*, 63: 642-651.
- Baayen R.P., Ouellette G.B., Rioux D. 1996. Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*. *Phytopathology* 86: 1018-1031.
- Bagad A. 2009. Environmental science and engineering, First edition. Technical publications Pune. Unit III: Environ. Pollut. Pune, India., pp.1-17.
- Barbieri de Souza C., Rodrigues Silva G. 2019. Phytoremediation of effluents contaminated with heavy metals by floating aquatic macrophytes species. *Bioengineering*. IntechOpen.
- Barco-Bonilla N., Romero-González R., Plaza-Bolaños P., Martínez Vidal J.L., Garrido Frenich A. 2013. Systematic study of the contamination of wastewater treatment plant effluents by organic priority compounds in Almeria province (SE Spain). *Sci. Total Environ.*, 447: 381-389.
- Basha K.M., Rajendran A., Thangavelu V. 2010. Recent advances in the biodegradation of phenol: A review. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, 1 (2): 219-234.
- Bazán R., Larrosa N., Busso F., Bonfanti E., Bonansea M., Cossavella A. 2017. Florecimientos de cianobacterias en el embalse Los Molinos. Córdoba-Argentina. IV Taller de Cianobacterias Toxígenas, Mar del Plata-Argentina, 62 pp.

- Bazán R., García M., Díaz Lozada J., Chalimond M., Herrero H., Bonansea M., Bonfanti E., Busso F., Cossavella A. 2019. Estudio multidisciplinario e interinstitucional de dos fuentes principales de agua potable para la Provincia de Córdoba. *Revista De La Facultad De Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC*, 5, 57.
- Biswas D.K., Scannell G., Akhmetov N., Fitzpatrick D., Jansen M.A.K. 2010. 2,4,6-Trichlorophenol mediated increases in extracellular peroxidase activity in three species of *Lemnaceae*. *Aquat. Toxicol.*, 100: 289-294.
- Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.*, 53: 1367-1376.
- Borişjuk N., Chu P., Gutierrez R., Zhang H., Acosta K., Friesen N., Sree K.S., Garcia C., Appenroth K.J., Lam E. 2015. Assessment, validation and deployment strategy of a two-barcode protocol for facile genotyping of duckweed species. *Plant Biol.*, 17 (1): 42-47.
- Briggs D. 2003. Environmental pollution and the global burden of disease. *Br. Med. Bull.*, 68: 1-24.
- Bukowska B., Kowalska S. 2004. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicol. Lett.*, 152 (1): 73-84.
- Busca G., Berardinelli S., Resini C., Arrighi L. 2008. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *J. Hazard. Mater.*, 160: 265-288.
- Calheiros C. S., Rangel A.O., Castro P.M. 2014. Constructed wetlands for tannery wastewater treatment in Portugal: ten years of experience. *Int. J. Phytoremediat.*, 16 (9): 859-870.
- Carlos F.S., Giovanella P., Bavaresco J., Borges C.S., Camargo F.A.O. 2016. A comparison of microbial bioaugmentation and biostimulation for hexavalent chromium removal from wastewater. *Water Air Soil Pollut.*, 227:175.
- Chandra R., Yadav S. 2010. Potential of *Typha angustifolia* for phytoremediation of heavy metals from aqueous solution of phenol and melanoidin. *Ecol. Engin.*, 36 (10): 1277-1284.
- Cherian S., Oliveira M. 2005. Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environ. Sci. Technol.*, 39: 9377-9390.
- Cho C., Yavuz-Corapcioglu M., Park S., Sung K. 2008. Effects of grasses on the fate of VOCs in contaminated soil and air. *Water Air Soil Pollut.*, 187: 243-250.
- Coniglio M.S., Busto V.D., González P.S., Medina M.I., Milrad S., Agostini E. 2008. Application of *Brassica napus* hairy root cultures for phenol removal from aqueous solutions. *Chemosphere*, 72: 1035-1042.
- Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). *Biochem. Mol. Biol. Plants*, 24: 1250-1319.
- Daly A., Zannetti, P. 2007. An introduction to air pollution - definitions, classifications and history. In: *Ambient air pollution. The Arab School for Science and Technology and The Enviro Comp Institute*, 1-14.
- D'Ambrogio de Argüeso A. 1986. *Manual de técnicas de histología vegetal*. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 83 pp.

- Darajeh N., Idris A., Truong P., Aziz A.A., Bakar R.A., Man H.C. 2014. Phytoremediation potential of vetiver system technology for improving the quality of palm oil mill effluent. *Adv. Mater. Sci. Eng.*, 1-10.
- Dargo H., Ayalew A. 2014. Tannery waste water treatment: A review. *Int. J. Emerg. Tren. Sci. & Tech.*, 1 (9): 1488-1494.
- Davis B.J. 1964. Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404-427.
- Day J.A., Saunders F.M. 2004. Glycosidation of chlorophenols by *Lemna minor*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 613-620.
- De Forchetti S.M., Tigier H.A. 1990. Indole-3-acetic acid oxidase and syringaldazine oxidase of peroxidase isozymes in soybean root nodules. *Physiol. Plant.*, 79: 327-330.
- Delgadillo-López A.E., González-Ramírez C.A, Prieto-García F., Villagómez-Ibarra J.R., Acevedo-Sandoval O. 2011. Phytoremediation: an alternative to eliminate pollution. A Review. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.*, 14: 597-612.
- Dhir B. 2013. Phytoremediation: Role of aquatic plants in environmental clean-up. New Delhi, India: Springer.
- Dietz A.C., Schnoor J.L. 2001. Advances in phytoremediation. *Environ. Health Perspect.*, 109: 163-168.
- Di Luca G.A., Maine M.A., Mufarrege M.M., Hadad H.R., Bonetto C.A. 2015. Influence of *Typha domingensis* in the removal of high P concentrations from water. *Chemosphere*, 138, 405-411.
- Dipu S., Kumar A.A., Thanga V.S.G. 2011. Phytoremediation of dairy effluent by constructed wetland technology. *Environmentalist*, 31 (3): 263-278.
- Dotro G., Tujchneider O., Paris M., Faggi A., Piovano N. 2010. Tratamiento de efluentes de curtiembre con humedales construidos calidad de vida UFLO, Universidad de Flores Año I, 4 (1): 77-92.
- Eapen S., Singh S., D'Souza S.F. 2007. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnol. Adv.*, 25: 442-451.
- El-Sayed W., Ibrahim M., Abu-Shady M., El-Beih F., Ohmura N., Saiki H., Ando A. 2003. Isolation and characterization of phenol-degrading bacteria from a coking plant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (9): 2026-2029.
- Ensley H.E., Sharma H.A., Barber J.T., Polito M.A. 1997. Metabolism of chlorinated phenols by *Lemna gibba* duckweed. In: Kruger E.L., Anderson T.A., Coats R. (Eds). *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, American Chemical Society, Washington D.C., pp. 238-253.
- EPA. 2002. Toxicological review of phenol. US.EPA, Washington D.C.
- Faouzi M., Benlemlih M., Merzouki M. 2013. Contribution to optimize the biological treatment of synthetic tannery effluent by the sequencing batch reactor. *J. Mat. Environm. Sci.*, 4 (4): 532-541.
- Fernández M. 2014. Tesis presentada para optar por el título de Microbiólogo, Fitorremediación de Cromo (VI) y fenol por macrófitas acuáticas autóctonas de la

provincia de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba), Argentina.

Forni C., Braglia R., Harren F.J.M., Cristescu S.M. 2012. Stress responses of duckweed (*Lemna minor* L.) and water velvet (*Azolla filiculoides* Lam.) to anionic surfactant sodium-dodecyl-sulphate (SDS). *Aquat. Toxicol.*, 107-113.

Gao J., Garrison A.W., Hochamer C., Mazur C.S., Wolfe N.L. 2000. Uptake and phytotransformation of *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT by axenically cultivated aquatic plants. *J. Agr. Food Chem.*, 48: 6121-6127.

Gerhardt K.E., Huang X.D., Glick B.R., Greenberg B.M. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci.*, 176: 20-30.

Gomez M.L., Martínez D.E. 2010. Municipal waste management and groundwater contamination processes in Córdoba Province, Argentina. *J. Appl. Sci.*, 5 (3): 28-46.

González P.S., Agostini E., Milrad S.R. 2008. Comparison of the removal of 2,4-dichlorophenol and phenol from polluted water, by peroxidases from tomato hairy roots, and protective effect of polyethylene glycol. *Chemosphere*, 70: 982-989.

González P., Talano M.A., Paisio C., Ontañón O., Armendariz A.L., Agostini E. 2013. *Brassica napus* hairy roots and rhizobacteria for phenolic compounds removal. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 20 (3): 1310-1317.

Gupta A., Balomajumder C. 2015. Removal of Cr(VI) and phenol using water hyacinth from single and binary solution in the artificial photosynthesis chamber. *J. Water Process Eng.*, 7: 74-82.

Hage K., Dijk J. 2002. Microbial removal of chlorinate aliphatic hydrocarbons from soil and groundwater. <http://www.ftns.wau.nl/imb/research/chlorhydrocarbon.html>.

Hamad I.S., Ahmed A.A.A. 2013. Biodegradation of phenols in wastewater using crude peroxidases from five weed plants, *J. Chem. Pharmaceut. Res.*, 5 (4): 60-65.

Harvey P.J., Campanella B.F., Castro P.M., Harms H., Lichtfouse E., Schäffner A.R., Smrcek S., Werck-Reichhart D. 2002. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ. Sci. Pollut. R. Int.*, 9 (1): 29-47.

Hejri S., Saboora A. 2009. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewaters by enzymatic treatments. *J Sci. University of Tehran, JUST* 35 (1): 13-9.

Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. 2001. A large family of class III peroxidases. *Plant Cell Physiol.*, 42: 462-468.

Hirata T., Ashida Y., Mori H., Yoshinaga D., Goad L.J. 2000. A 37 KDa peroxidase secreted from liverworts in response to chemical stress. *Phytochemistry*, 55: 197-202.

Hoagland D.R., Arnon D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Cal. Agric. Exp. Sta. Cir.*, 347: 32.

Iurascu B., Siminiceanu I., Vione D., Vicente M.A., Gil A. 2009. Phenol degradation in water through a heterogeneous photo-fenton process catalyzed by Fe- treated laponite. *Water Res.*, 43: 1313-1322.

- Jansen M.A.K., Van Den Noort R.E., Tan M.Y.A., Prinsen E., Lagrimini L.M., Thorneley R.N.F. 2001. Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol.*, 126: 1012-1023.
- Jansen M.A.K., Hill M.L., Thorneley R.M.F. 2004. A novel stress-acclimation response in *Spirodela punctata* (*Lemnaceae*): 2,4,6-Trichlorophenol triggers an increase in the level of an extracellular peroxidase, capable of the oxidative dechlorination of the xenobiotic pollutant. *Plant Cell Environ.*, 27: 603-613.
- Jha P., Jobby R., Kudale S., Modi N., Dhaneshwar A., Desai N. 2013. Biodegradation of phenol using hairy roots of *Helianthus annuus* L. *Int. Biodeter. Biodeg.*, 77: 106-113.
- Johansen D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Company Inc., 523 p.
- Khan A.G. 2004. Mycotrophy and its significance in wetland ecology and wetland management. In: Wong MH (ed) *Developments in ecosystems*, vol 1. Elsevier, Northhampton, pp 97-114.
- Kolhe P.M., Ingle S.T., Wagh N.D. 2015. Degradation of phenol containing wastewater by advance catalysis system. A review. *Ann. Res. Rev. Bio.*, 8 (3): 1-15.
- Komives T., Gullner G. 2005. Phase I xenobiotic metabolic systems in plants. *Z Naturforsch.*, 60: 179-185.
- Kumari M., Tripathi B. 2014. Effect of aeration and mixed culture of *Eichhornia crassipes* and *Salvinia natans* on removal of wastewater pollutants. *Ecol. Eng.*, 62: 48-53.
- Lagunes-Fortiz E., Zavaleta-Mejía E. 2016. Función de la lignina en la interacción planta-nematodos endoparásitos sedentarios. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 34 (1): 43-63.
- Landesman L., Fedler C., Duan R. 2011. Plant nutrient phytoremediation using duckweed. In: *Eutrophication: causes, consequences and control*. Edited by: Ansari A.A., Gill S.S., Lanza G.R., Rast W. Springer-Verlag, Berlin, Germany 341-354.
- Landolt E., Kandeler R. 1987. The family of *Lemnaceae* - a monographic study, Vol 2 (heft 95), biosystematic investigations in the family of duckweeds (*Lemnaceae*). Geobotanischen Institutes der Eidgenössisch Technische Hochschule, Stiftung Rübel, Zurich., pp. 638.
- Langer M., Väänänen J., Boulestreau M., Miede U., Bourdon C., Lesjean, B. 2017. Advanced phosphorus removal via coagulation, flocculation and microsieve filtration in tertiary treatment. *Water Sci. Technol.*, 75 (12): 2875-2882.
- Liu X., Li X., Chemane-Ong S.M., Chu Z. 2013. Progress of phytoremediation: focus on new plant and molecular mechanism. *J. Plant Biol. Soil Health*, 1 (1): 5.
- Mackova M., Barriault D., Frankova K., Sylvestre M., Möder M., Vrchotova B., Lovecka P., Najmanova J., Demnerova K., Novakova M., Rezek J., Macek T. 2006. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls. In: Mackova M., Dowling, D.N., Macek, T. (Eds.), *Phytoremediation and Rhizoremediation*. Springer, Netherlands, pp. 143-167.
- Maine M.A., Hadad H.R., Sánchez G., Caffaratti S., Pedro M.D.C. 2016. Kinetics of Cr (III) and Cr (VI) removal from water by two floating macrophytes. *Int. J. Phytoremediat.*, 18 (3): 261-268.

- Majumder A., Jha S. 2012. Hairy roots: A promising tool for phytoremediation. In: Satyanarayana T., Johri B., Prakash A. (eds) *Microorganisms in Environmental Management. Microbes and Environment*. Springer, Netherlands, pp 607-629.
- Merlo C., Abril A., Amé M.V., Argüello G.A., Carreras H.A., Chiappero M.S., González C.M. 2011. Integral assessment of pollution in the Suquía river (Córdoba, Argentina) as a contribution to lotic ecosystem restoration programs. *Sci. Total Environ.*, 409 (23): 5034-5045.
- Michałowicz J., Duda W. 2007. Phenols-sources and toxicity. *Polish J. of Environ. Stud.*, 16 (3): 347-362.
- Mithaishvilia T., Scalla R., Ugrekhelidzea D., Tseretelia B., Sadunishvilia T., Kvesitadzea G. 2005. Degradation of aromatic compounds in plants grown under aseptic conditions. *Z. Naturforschung: C* 60: 97-102.
- Morales R.S., Caldas Y.C. 2009. Evaluación del tratamiento de aguas residuales con *Lemna gibba* en estanques con régimen de flujo de pistón. *Afinidad*, 66 (541).
- Nair C., Jayachandran K., Shashidhar S. 2008. Biodegradation of phenol. *African J. Biotechnol.*, 7 (25): 4951-4958.
- Nazari K., Esmaeili N., Mahmoudi A., Rahimi H., Moosavi-Movahedi A.A. 2007. Peroxidative phenol removal from aqueous solution using activated peroxidase biocatalyst. *Enzyme Microb. Technol.*, 41: 226-233.
- Nepovim A., Podlipná R., Soudek P., Schröder P., Vanek T. 2004. Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase. *Chemosphere*, 57: 1007-1015.
- Nuñez López R.A., Vong Y.M., Ortega Borges R., Olguín E.J. 2004. Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia*, 69-82.
- Okoduwa S.I.R., Igiri B., Udeh C.B., Edenta C., Gauje B. 2017. Tannery effluent treatment by yeast species isolates from watermelon. *Toxics*, 5 (6): 2-10.
- Ontañón O., González P., Agostini E. 2015. Biochemical and molecular mechanisms involved in simultaneous phenol and Cr (VI) removal by *Acinetobacter guillouiae* SFC 500-1A. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 22 (17): 13014-13023.
- Paisio C.E., Agostini E., González P.S., Bertuzzi M.L. 2009. Lethal and teratogenic effect of phenol on *Bufo arenarum* embryos. *J. Hazard. Mater.*, 167: 64-68.
- Paisio C.E., Talano M.A., González P.S., Busto V.D., Rodríguez Talou J., Agostini E. 2012. Isolation and characterization of a *Rhodococcus* strain with phenol-degrading ability and its potential use for tannery effluent biotreatment. *Environ. Sci. Poll. R.*, 19 (8): 3430-3439.
- Paisio C.E., Talano M.A., González P.S., Pajuelo-Domínguez E., Agostini E. 2013. Characterization of a phenol degrading bacterium isolated from an industrial effluent and its potential application for bioremediation. *Environ. Tech.*, 34 (4): 485- 493.
- Paisio C.E., Fernández M., González P.S., Talano M.A., Medina M.I., Agostini E. 2018. Simultaneous phytoremediation of chromium and phenol by *Lemna minuta* Kunth: a promising biotechnological tool. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 15: 37-48.

- Pandey V.P., Awasthi M., Singh S., Tiwari S., Dwivedi U.N. 2017. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem. Anal. Biochem.*, 6.
- Park J.S., Brown M.T., Han T. 2012. Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicosta*. *Aquatic Toxicol.*, 106-107: 182-188.
- Pascal-Lorber S., Rathahao E., Cravedi J.P., Laurent F. 2004. Metabolic fate of [¹⁴C]-2,4-dichlorophenol in macrophytes. *Chemosphere*, 56: 275-284.
- Phenrat T., Teeratitayangkul P., Prasertsung I., Parichatprecha R., Jitsangiam P., Chomchalow N., Wichai S. 2017. Vetiver plantlets in aerated system degrade phenol in illegally dumped industrial wastewater by phytochemical and rhizomicrobial degradation. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 24 (15): 13235-13246.
- Pilon-Smits E.A.H., Freeman J.L. 2006. Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerations *Front. Ecol. Environ.*, 4: 203-210.
- Radulovic O., Petrić M., Raspor M., Tadić V., Jovanović P., Zečević V. 2019. Assessment of in vitro multiplication of *Lemna minor* in the presence of phenol: Plant/bacteria system for potential bioremediation - Part I. *Pol. J. Environ. Stud.*, 28 (2): 803-809.
- Reichenauer T.G., Germida J.J. 2008. Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *Chem Sus Chem.*, 1: 708-717.
- Reis A.R., Tabei K., Sakakibara Y. 2014. Oxidation mechanism and overall removal rates of endocrine disrupting chemicals by aqueous plants. *J. Hazard. Mater.*, 265: 79-88.
- Reisfeld R.A., Lewis U.J., Williams D.E. 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 107: 21-24.
- Rodriguez-Hernandez M.C., García De la Cruz R.F., Leyva E., Navarro-Tovar G. 2017. *Typha latifolia* as potential phytoremediator of 2,4-dichlorophenol: analysis of tolerance, uptake and possible transformation processes. *Chemosphere*, 173: 190-198.
- Sandermann H. 1994. Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green liver” concept. *Pharmacogenetics*, 4 (5): 225-241.
- Sasmaz A., Dogan I.M., Sasmaz M. 2016. Removal of Cr, Ni and Co in the water of chromium mining areas by using *Lemna gibba* L. and *Lemna minor* L. *Water Environ. J.*, 30: 235-242.
- Scavo M., Rodriguez O., Luque O. 2004. Estudio de un sistema de tratamiento de aguas residuales complementario, con pasto vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.), provenientes de una planta de producción de gaseosas. Villa de Cura, estado Aragua. (Tesis de Maestría Ingeniería Agrícola, Facultad de Agronomía). Caracas: Universidad Central de Venezuela.
- Schnoor J.L., Licht L.A., McCutcheon S.C., Wolfe N.L., Carreira L.H. 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminant. *Environ. Sci. Technol.*, 29: 318-323.
- Schröder P., Collins C.J. 2002. Conjugating enzymes involved in xenobiotic metabolism of organic xenobiotics in plants. *Int. J. Phytoremediat.*, 4: 1-15.
- Schröder P., Daubner D., Maier H., Neustifter J., Debus R. 2008. Phytoremediation of organic xenobiotics-glutathione dependent detoxification in Phragmites plants from European treatments sites. *Biores. Technol.*, 99: 7183-7191.

- Sharma S., Singh B., Manchanda V.K. 2015. Phytoremediation: role of terrestrial plants and aquatic macrophytes in the remediation of radionuclides and heavy metal contaminated soil and water. *Environ. Sci. Pollut. R.*, 22 (2): 946-962.
- Singh S., Melo J.S., Eapen S., D'Souza S.F. 2006. Phenol removal using *Brassica juncea* hairy roots: role of inherent peroxidase and H₂O₂. *J. Biotechnol.*, 123: 43-49.
- Singh S., Melo J.S., Eapen S., D'Souza S.F. 2008. Potential of vetiver (*Vetiveria zizanoides* L. Nash) for phytoremediation of phenol. *Ecotox. Environ. Safe.*, 71: 671-676.
- Sinha R.K., Valani D., Sinha S. 2010. Environmental biotechnologies of contaminated lands and soil by microbes, plants and earthworms. *Environmental remediation technologies, regulations and safety*. Nova Science Publishers, Inc. New York., pp. 55.
- Solís S.L.M., López A.J.A. 2003. Principios básicos de contaminación ambiental. Toluca, México: Universidad Autónoma del Estado de México.
- Sosa Alderete L.G., Talano M.A., Ibáñez S.G., Purro S.A., Agostini E., Milrad S.R., Medina M.I. 2009. Establishment of transgenic tobacco hairy roots expressing basic peroxidases and its application for phenol removal. *J. Biotechnol.*, 139: 273-279.
- Sridhar M.B.B., Diehl S.V., Han F.X., Monts D.L., Su Y. 2005. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cu in Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ. Exp. Bot.*, 54: 131-141.
- Su C., Jiang Y., Yang Y., Zhang W., Xu Q. 2019. Responses of duckweed (*Lemna minor* L.) to aluminum stress: physiological and proteomics analyses *Ecotox. Environ. Safe.*, 170: 127-140.
- Susarla S., Medina V.F., McCutcheon S.C. 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.*, 18: 647-658.
- Sweidan K., Fayyad M. 2006. The use of duckweed for removal of heavy metals and organic compounds from wastewater in As-Samra. *Fresen. Environ. Bull.*, 15 (5): 354-359.
- Talano M.A., Frontera S., González P.S., Medina M.I., Agostini E. 2010. Removal of 2,4-dichlorophenol from aqueous solutions using tobacco hairy root cultures. *J. Hazard. Mater.*, 176: 784-791.
- Tiwari S., Tripathi A., Gaur R. 2017. Bioremediation of plant refuges and xenobiotics. In: *Principles and applications of environmental biotechnology for a sustainable future*. Springer, Berlin, pp 85-142.
- Ugrekheldze D., Friedhelm K., Kvesitadze G. 1997. Uptake and transformation of benzene and toluene by plant leaves. *Ecotox. Environ. Safe.*, 37: 24-29.
- Ugrekheldze D., Kvesitadze G., Arziani B., Mithaishvili T., Phiriashvili V. 1999. Detoxification of phenol in annual plant seedlings. *Ecotox. Environ. Safe.*, 42: 119-124.
- US EPA. 1989. Generalized methodology for conducting industrial reduction evaluations TREs, EPA 600/2-88/070.
- Wagner M., Nicell J.A. 2002. Detoxification of phenolic solutions with horseradish. *Water Res.*, 36: 4041-4052.

Wang Z., Xu Y., Zhao J., Fengmin L., Gao D., Xing B. 2011. Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation. *J. Hazard. Mater.*, 190: 677-685.

Welinder K.G., Justesen A.F., Kjærsgård I.V.H., Jensen R.B., Rasmussen R.K., Jespersen H.M., Duroux L. 2002. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.*, 269: 6063-6081.

Zhang K., Bhuiya M.W., Pazo J.R., Miao Y., Kim H., Ralph J., Liua C.J. 2012. An engineered monoglucosyltransferase depresses lignin biosynthesis and confers novel metabolic capability in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Preview*, American Society of Plant Biologists, 1-18.

Zhao F., Mayura K., Hutchison R.W., Lewis R.P., Burghardt R.C., Phillips T.D. 1995. Developmental toxicity and structure-activity relationships of chlorophenols using human embryonic palatal mesenchymal cells. *Toxicol. Lett.*, 78 (1): 35-42.

Zhou Z.Y., Liu W.X., Pei G., Ren H., Wang J., Xu Q.L., Xie H.H., Wan F.H., Tan J.W. 2013. Phenolics from *Ageratina adenophora* roots and their phytotoxic effects on *Arabidopsis thaliana* seed germination and seedling growth. *J. Agric. Food Chem.*, 61 (48): 11792-11799.

Ziegler P., Sree K.S., Appenroth K.J. 2016. Duckweeds for water remediation and toxicity testing. *Toxicol. Environ. Chem.*, 98: 1127-1154.

Páginas web consultadas:

<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp115.html>. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2008.

<http://www.cecopal.org/derecho/DNacional/DN-831-93.htm>. Ley Nacional Argentina N° 24.051 Decreto 831/93. Reglamentación de Residuos Peligrosos.

<http://www.epa.gov/tri/chemical/index.htm>.

[http://web2.cba.gov.ar/web/leyes.nsf/85a69a561f9ea43d03257234006a8594/37756ff5e7ed18be032580910054765a/\\$FILE/847-16%20ANEXO%20UNICO.pdf](http://web2.cba.gov.ar/web/leyes.nsf/85a69a561f9ea43d03257234006a8594/37756ff5e7ed18be032580910054765a/$FILE/847-16%20ANEXO%20UNICO.pdf)

ANEXO

Solución de riego para plantas: Hoagland 1/2 (Hoagland y Arnon, 1950)

KH₂PO₄ 1M.....0,5 mL/L

KNO₃ 1M.....3,0 mL/L

Ca (NO₃)₂ 1M.....2,0 mL/L

MgSO₄ 1M.....1,0 mL/L

Stock micronutrientes*.....0,5 mL/L

Stock Hierro *1.....1,0 mL/L

* Stock micronutrientes (1000X) para 100 ml

H₃BO₃.....286,0 mg

MnCl₂ 4H₂O.....901,3 mg

ZnSO₄ 7H₂O.....21,8 mg

CuSO₄ 5H₂O.....8,0 mg

Na₂MoO₄ 2H₂O.....2,6 mg

*1 Stock Hierro al 0,5%

EDTA Na₂.....7,45 g/L

FeSO₄ 7H₂O.....5,57 g/L