

Efectos del Níquel, Zinc y Cadmio sobre la morfología y el contenido de pigmentos de *Lemna gibba* L.

Martinez Ricardo Santiago¹, Di Marzio Walter Darío^{1,2} , Alberdi José Luis¹ y Sáenz María Elena^{1,2,*} 

¹ Departamento de Ciencias Básicas, Programa de Investigación en Ecotoxicología, Universidad Nacional de Luján, C.C. 221 (6700) Luján, Argentina.

² CONICET Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Av Rivadavia 1917 (C1033AAJ) CABA, Argentina.

* Corresponding author: mesaenz@aae.org.ar

Received: 01/03/23

Accepted: 24/05/23

RESUMEN

Efectos del Níquel, Zinc y Cadmio sobre la morfología y el contenido de pigmentos de *Lemna gibba* L.

El presente estudio tuvo como objetivo investigar los efectos de los metales pesados Níquel (Ni), Zinc (Zn) y Cadmio (Cd) sobre diferentes parámetros morfométricos y pigmentos de la macrófita acuática *Lemna gibba*. El Ni produjo una disminución del área y de los ejes longitudinal y transversal de las frondes, a partir de 0.37 mg/L y 0.92 mg/L respectivamente. El Zn produjo una disminución en estos parámetros a partir de concentraciones de exposición de 4.6 mg/L. El Cd, por su parte, ejerció efectos sobre el eje transversal a menores concentraciones de exposición (0.13 mg/L) que aquellas que afectaron el área (0.26 mg/L) y los ejes longitudinales de las frondes (2.06 mg/L). Tanto el Zn como el Cd tuvieron un efecto de desagregación de las colonias. A partir de concentraciones de Zn de 20.1 mg/L la relación frondes/colonias disminuyó en función del aumento de las concentraciones de exposición. En el caso del Cd este efecto se observó a partir de 0.26 mg/L. Se observó una disminución del contenido de pigmentos en las frondes expuestas a los tres metales, con excepción de la clorofila *b* y total de carotenos para el Cd. El Ni fue el metal que más afectó el contenido de pigmentos. El área total fue el parámetro que arrojó valores más bajos de los índices de toxicidad para evaluar efectos a largo plazo (NOEC y LOEC) de los metales estudiados, representando así una buena variable de predicción de estos efectos. Las curvas de concentración-respuesta demuestran una mayor toxicidad del Ni, seguido por el Cd, con una acción menos adversa del Zn sobre *L. gibba*. Las características morfométricas de las frondes junto con la relación frondes/colonias de *L. gibba* podría ser utilizado en la detección temprana de efectos de metales sobre este grupo de macrófitas fundamentales por su función en ambientes dulceacuícolas, en particular, los sistemas acuáticos bonaerenses.

Palabras clave: metales pesados, morfología, pigmentos, toxicidad, *Lemna gibba*

ABSTRACT

Effects of Nickel, Zinc and Cadmium on morphology and pigments of *Lemna gibba* L.

The present study aimed to study the phytotoxic effects of Nickel (Ni), Zinc (Zn) and Cadmium (Cd) on morphological characteristics and pigments of the macrophyte *Lemna gibba*. Ni decreased the area and the frond longitudinal and transversal axis from 0.37 mg/L and 0.92 mg/L respectively. Zn reduced these morphological parameters from concentration of 4.6 mg/L. Cd exerted effects on frond transversal axis at lower exposure concentrations (0.13 mg/L) than those affecting frond area (0.26 mg/L) and frond longitudinal axis (2.06 mg/L). Both Zn and Cd caused a disaggregation of colonies. From Zn concentrations of 20.1 mg/L, the fronds/colonies ratio decreased as a function of the increase in exposure concentrations. This effect was observed from 0.26 mg/L in the case of plants exposed to a gradient of Cd concentrations. A decrease in pigment content was observed for the three heavy metals, with the exception of chlorophyll *b* and total carotenoids in the case of plants treated with Cd. Ni was the metal that most affected the pigment content. The total area was the parameter that yielded the lowest values of the toxicity indices to evaluate long-term effects (NOEC and LOEC) of the metals studied, thus representing a good predictor variable of these effects. Concentration-response curves showed a higher toxicity of Ni, followed by Cd with less toxicity exert-

ed by Zn on plants of L. gibba. The morphometric characteristics of the fronds together with the fronds/colonies relationship of L. gibba could be used in the early detection of metal effects on this group of fundamental macrophytes due to their function in freshwater environments, in particular, Buenos Aires aquatic systems.

Key words: *heavy metals, morphology, pigments; toxicity, Lemna gibba*

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) License.

INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas acuáticos son los receptores tanto de materia orgánica como de diferentes compuestos artificiales de origen industrial, agrícola y de desecho, provenientes de los ecosistemas terrestres. Expresan la presión recibida desde los ecosistemas terrestres de la cuenca que drenan, por lo cual el estado de las aguas epicontinentales de una región refleja también el estado en que se encuentran los ecosistemas terrestres (Chen et al., 2014, Rodríguez 2016). Las actividades antrópicas generan aguas residuales que contienen sustancias químicas de diversa naturaleza resultando en una mezcla compleja de sustancias orgánicas e inorgánicas, compuestos persistentes y bioacumulables, que son a menudo descargadas al ambiente sin el apropiado tratamiento (Chorom et al., 2012, Doğanlar, 2013, Verma & Suthar, 2015, Dogan et al., 2018). Los metales son componentes inorgánicos persistentes que forman parte de las aguas residuales generadas por las distintas actividades humanas.

La contaminación por metales pesados es uno de los problemas ambientales más significativos en la actualidad, cuyas tres causas principales son la industrialización, agricultura y urbanización (Álvarez et al., 2017, Fernandez et al., 2018). Debido a la toxicidad de los mismos, ya que son no degradables y por lo tanto persistentes en la naturaleza, se acumulan en la cadena alimenticia donde con el tiempo alcanzan niveles perjudiciales en los sistemas vivos. La rápida industrialización ha incrementado enormemente la tasa de liberación de metales, en particular Ni, Zn y Cd, y su ingreso a los sistemas acuáticos. Entre las actividades más importantes se pueden destacar las curtiembres, textiles, metalúrgicas, fábricas de galvanizado, refinерías, farmacéuticas y producción de pesticidas y fertilizantes (Häder et al.,

2020; Seenivasagan et al., 2022). En particular, la actividad minera, catalogada como actividad del sector primario, libera al ambiente importantes cantidades de Ni y Zn, entre otros metales, alcanzando aguas superficiales y subterráneas (Li et al., 2015, Sanliyüksel Yucel et al., 2016). En el futuro se espera una mayor demanda de estos metales, ya que las baterías con cátodos de Ni resultan con mayor eficiencia y con una más alta densidad energética, combinados con ánodos de Zn y Cd (Yang et al., 2021)

Si bien algunos metales pesados como el Ni y Zn cumplen una importante función como micronutrientes, cuando se encuentran en altas concentraciones producen efectos adversos en los organismos impactando y afectando el funcionamiento y estructura de los ecosistemas (Nordberg et al., 2007, Kumar et al., 2016). Otros metales no tienen funciones esenciales conocidas, como el caso de Cd, y producen manifestaciones tóxicas cuando la incorporación en los tejidos aumenta moderadamente con respecto a una situación “normal”. Además, el Cd es un contaminante ambiental ampliamente extendido, considerado de extrema significancia debido no solo a su alta toxicidad para los organismos, sino también a su alta solubilidad en agua, facilitando esto su distribución en los ecosistemas acuáticos (Li & Xiong, 2004).

En cuanto al comportamiento de los metales en los ecosistemas acuáticos, se encuentran relacionados a la materia orgánica disuelta, por procesos como sorción o quelación. Los ácidos húmicos y fúlvicos interaccionan con ellos afectando su biodisponibilidad (Zhang et al., 2020). Una vez en los sistemas, pueden ser tomados por los organismos residentes, entre ellos las macrófitas acuáticas o hidrófitas, siendo de esta forma buenos centinelas de la presencia de metales pesados (Harguinteguy et al., 2014). Las macrófitas contribuyen significativamente en la producción

primaria de los ambientes acuáticos. Esta comunidad provee la energía básica para las redes alimentarias aún en los sistemas donde la entrada de energía alóctona es considerable, donde pueden contribuir significativamente al flujo de energía del sistema. Las macrófitas cumplen una importante función en la incorporación de nutrientes al ciclo energético del sistema, en el mantenimiento de las características físicas y químicas del sistema, en la oxigenación de las aguas, la estabilización de los sedimentos y proveen de hábitat para una variedad de organismos acuáticos, tanto invertebrados como vertebrados (Rodrigues Capítulo et al., 2004, Thomaz & Cunha, 2010). Es así como los cambios en la dinámica de la comunidad de las hidrófitas de un ecosistema afectarán a las comunidades de micro, macroinvertebrados y peces, afectando así a todo el ecosistema (Belgers et al., 2007, Thomaz & Cunha, 2010).

En particular, los sistemas acuáticos lénticos de la llanura pampeana se caracterizan por ser de escasa profundidad, de carácter permanente, con perfil en forma de sartén, con sedimento propio diferente al suelo circundante, sin ciclo térmico definido ni estratificación térmica ni química, con circulación continua todo el año y sin diferenciación entre zona litoral y central (Ringuelet, 1972). Se trata de cuerpos de agua eutróficos naturales ya que se sitúan en zonas fértiles donde el drenaje natural aporta una carga elevada de nutrientes. Estos aportes han aumentado en las últimas décadas debido a las distintas actividades antrópicas mencionadas con anterioridad, relacionadas al uso de la tierra originando aportes de fertilizantes y plaguicidas, desarrollo urbano, obras de regulación y descarga de efluentes domésticos sin tratar. De esta manera estos sistemas presentan en la actualidad una tendencia a la hipertrofia con un deterioro de la calidad del agua (Quiroz et al., 2002, Diovisalvi et al., 2010, Volpedo & Fernández Cirelli, 2013, Romanelli & Massone, 2016). Otra característica que presentan es el desarrollo de comunidades de macrófitas sumergidas y flotantes, siendo las lemnáceas, llamadas comúnmente “lentejas de agua”, las principales componentes de estas asociaciones vegetales (pleuston), albergando una importante diversidad de mesofauna y microfauna (Ronderos et al., 1968, Ringuelet, 1972). Estas asociaciones vegetales invaden par-

cialmente el espejo lagunar, encontrándose principalmente en las áreas más tranquilas, entre la vegetación emergente o formando cubiertas flotantes en las áreas marginales. (Diovisalvi et al., 2010). Además de proveer de microhábitats para distintos organismos actúan como reservorios reteniendo nutrientes, sedimentos y contaminantes (Volpedo & Fernández Cirelli, 2013).

Debido a la necesidad de encontrar estrategias que permitan la detección temprana de alteraciones en los ecosistemas acuáticos, el objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos del Ni, Zn y Cd sobre caracteres morfométricos y pigmentos de la especie *Lemna gibba*. Las determinaciones incluyeron el número de frondes, área total, ejes longitudinales y transversales de las frondes, relación frondes/colonias y los contenidos de clorofila *a*, *b* y carotenos totales. Se caracterizó la acción de estos metales sobre *L. gibba* mediante la obtención de la relación entre las concentraciones de los metales y las respuestas biológicas mencionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos utilizados

Los reactivos utilizados fueron de grado y pureza analítica. Las soluciones de exposición fueron preparadas desde una solución madre concentrada de cada uno de los tres metales. El reactivo utilizado para los ensayos con Zn fue el $ZnCl_2$ (cloruro de zinc); para los de Ni fue el $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ (sulfato de níquel (II) hexahidratado), ambos de la marca Biopack[®]. Mientras que se utilizó $CdCl_2 \cdot H_2O$ (cloruro de cadmio monohidratado) de la marca Anedra[®] para preparación de la solución madre de los ensayos con Cd.

Determinaciones analíticas

Se realizaron las mediciones analíticas de cada metal mediante espectroscopia de absorción atómica utilizando llama aire-acetileno u horno de grafito, (Método #3111; APHA 1998, Método #3112B; APHA, 1998). El límite de detección para estos metales fue de 0.05 mg/L. Se utilizó un espectrómetro de absorción atómica marca PerkinElmer modelo Aanalyst 200. Las soluciones de metales se filtraron al vacío con papel

de filtro, se acidificaron a $\text{pH} \leq 2$ y se guardaron a 4°C hasta el momento de ser analizadas. Todos los valores de concentraciones iniciales de exposición indicados en este trabajo son valores determinados analíticamente. Las diferencias entre concentraciones medidas y nominales variaron entre el 1–9 % (Martinez, 2019)

Condiciones de cultivo y ensayos de toxicidad

Se emplearon plantas de la especie *Lemna gibba*, angiospermas monocotiledóneas pertenecientes a la Familia Araceae, Subfamilia Lemnoidae (APG IV, 2016). Las plantas fueron recolectadas de un estanque natural libre de contaminación antrópica en el campo de la Universidad Nacional de Luján y mantenidas en condiciones de laboratorio por al menos dos semanas previo a su utilización. Las condiciones de cultivo y evaluación fueron seguidas de acuerdo con la norma OECD (2006). El medio de cultivo 20X AAP (Algal Assay Procedure) fue utilizado tanto para aclimatación de las plantas como para los ensayos. Los ensayos fueron realizados en Erlenmeyer de 250-ml que contenían 100 ml de medio de cultivo con el agregado de las distintas concentraciones de los metales. Los cultivos controles correspondieron a la incubación de las plantas en el mismo medio sin la adición de los metales. Los ensayos se iniciaron agregando un número inicial de 12 frondes por recipiente. La duración de los mismos fue de 7 días, bajo luz blanca fluorescente fría continua, de una intensidad promedio de 6000 lux a $24 \pm 2^\circ\text{C}$. (OECD, 2006, Martinez, 2019)

Las concentraciones de exposición fueron seleccionadas teniendo en cuenta ensayos preliminares de cada metal. Los ensayos preliminares o “Range Finding Test” consisten en ensayar un rango amplio de concentraciones de cada metal mediante una escala logarítmica, con el fin de conocer el rango de acción tóxica. Es así como el intervalo de concentraciones para los ensayos definitivos estará comprendido entre la mayor concentración que no produjo efectos (0 %) y la menor que causó 100 % de efecto sobre la variable respuesta estudiada de los ensayos preliminares (Di Marzio & Sáenz 2013). Así, estas concentraciones para el Zn fueron: 2.3 - 4.6 - 9.2 - 20.1 - 36.7 - 74.6 - 183 - 284 - 587 mg Zn/L. Las concentraciones

evaluadas de Ni fueron: 0.18 - 0.37 - 0.92 - 1.46 - 3.61 - 6 - 11.82 - 23.97 mg Ni/L. Mientras que las concentraciones de Cd fueron de 0.13 - 0.26 - 0.52 - 1.03 - 2.06 - 4.13 - 8.26 - 16.51 - 33.02 mg Cd/L. Se utilizaron tres réplicas por cada una de las concentraciones mencionadas para cada metal.

Parámetros evaluados

Al cabo de los 7 días de exposición a cada uno de los metales, se determinaron los caracteres morfométricos, la relación frondes-colonias y el contenido de pigmentos en las plantas tratadas y controles. Debido a que durante ese tiempo de exposición se obtienen varias generaciones de individuos, estos ensayos permiten tanto la determinación de efectos a corto plazo (agudos) como a largo plazo (crónicos).

Caracteres morfométricos

Los caracteres morfométricos determinados fueron el área, la longitud del eje longitudinal y la longitud del eje transversal de cada una de las frondes individuales de las plantas. Tanto el área como los ejes fueron medidos mediante la utilización del software de análisis de imágenes ImageJ versión 1.48v, desarrollado por el National Institutes of Health (USA). A tal fin, las plantas fueron retiradas del medio de exposición mediante la utilización de un pincel con cerdas de Marta y colocadas en un cristizador de 7 cm de diámetro para la captura de las imágenes digitales que servirían luego para la medición del área y ejes. La cámara empleada fue una Olympus Digital modelo SP800UZ y se obtuvieron imágenes con una resolución horizontal y vertical de 72 pixeles por pulgada (Martinez, 2019).

Relación frondes-colonias

Se determinó el número de frondes madres e hijas y el número de colonias en los cultivos tratados y controles, al cabo del tiempo de exposición. Se retiraron las plantas de las soluciones de prueba y los controles utilizando un pincel de cerdas de Marta. Posteriormente se las colocaron en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo y se procedió a realizar el conteo de frondes madres e hijas, con

la ayuda de un microscopio estereoscópico marca Nikon SMZ-2T utilizando un aumento de 5X. Se consideraron frondes madres a aquellas bien desarrolladas que poseían una fronde hija unida a ella, mientras que una fronde hija fue considerada aquella fronde desarrollada, aunque más pequeña, que ha emergido completamente del bolsillo lateral de la fronde que la originó, pero permanece unida a ella y no posee yemas o frondes hijas unidas. Las frondes nuevas o hijas permanecen conectadas a la fronde progenitora formando grupos clonales o colonias. Una colonia, que se la individualiza como una planta, se define como un agregado de frondes madre e hijas (generalmente 2 a 4) que se mantienen unidas entre sí, por medio de una estructura llamada estípite. Generalmente, las frondes hijas son liberadas luego de la madurez. Se calculó la relación frondes/colonias. Esta proporción sirve como parámetro de evaluación del nivel de desagregación de las plantas (Landolt & Zarzycki, 1994, Martínez, 2019)

Pigmentos fotosintéticos

Se evaluó el contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y contenido total de carotenos. La determinación de contenido en clorofila *a*, *b* y el total de carotenos se realizó según Lichtenthaler (1987). Al finalizar el período de exposición de 7 días, las plantas fueron retiradas del medio de cultivo, secadas con papel absorbente y se determinó el peso fresco final. Luego, las plantas se colocaron en mortero y se maceraron con acetona 90 %. El homogenato obtenido fue centrifugado. El sobrenadante (extracto) se retiró y fue utilizado para medición en espectrofotómetro UV 1800 marca Shimadzu a las longitudes de onda: 450, 630, 645, 663 y 750 nm. Los valores de dichas absorbancias fueron utilizados para calcular las concentraciones de las clorofilas y carotenos, expresadas en mg/gr de peso fresco.

Análisis estadístico y estimación de los índices de toxicidad

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos fueron analizados respecto al cumplimiento de normalidad mediante el test de Bartlett y de homogeneidad de varianzas mediante el test de Shapiro-Wilks. El análisis de las diferencias ob-

servadas entre los grupos tratados y los controles fue realizado mediante análisis de la varianza (ANOVA) de un factor combinado con el test de Dunnett. Para tal fin se utilizó el programa de computación TOXSTAT V 3.5 (West Inc and Gulley, 1996). Los ensayos de toxicidad con *Lemna* sp. son denominados ensayos de inhibición de crecimiento, pudiendo estimarse tanto índices de toxicidad agudos como crónicos al cabo del tiempo de exposición de 7 días, ya que en ese período de tiempo se realiza la evaluación de los efectos sobre varias generaciones de individuos (OECD 2006). Se estimaron los índices de toxicidad IC50 (Inhibition Concentration 50 - Concentración Inhibitoria 50) (concentración de una sustancia que causa un 50 % de reducción o inhibición en un determinado parámetro evaluado después de un periodo de exposición específico), NOEC (No Observed Effect Concentration - Concentración de no efecto) (concentración máxima evaluada en la cual no se registran efectos significativamente diferentes respecto de los organismos controles) y LOEC (Lowest Observed Effects Concentration - concentración de efecto más baja) (concentración mínima evaluada en la cual se registran efectos significativamente diferentes respecto de los organismos control) a los 7 días de exposición basándose en el número de frondes y en el área total, mediante la función analítica Solver de Microsoft Excel versión 2010. Las curvas concentración-respuesta fueron realizadas con el software TRAP (Toxicity Relationship Analysis Program) Versión 1.30a (US EPA, 2015).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Níquel

Los resultados obtenidos de la acción del Ni sobre el área y ejes longitudinal y transversal de las frondes se observan en la Tabla 1. El área de las frondes resultó significativamente disminuida a concentraciones de exposición de 0.37 mg/L y superiores (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$), mientras que la menor concentración de exposición de Ni de 0.18 mg/L no ejerció efectos significativos sobre el área total respecto a los controles. Se observó una respuesta dependiente de la concentración donde el valor del área total disminuyó

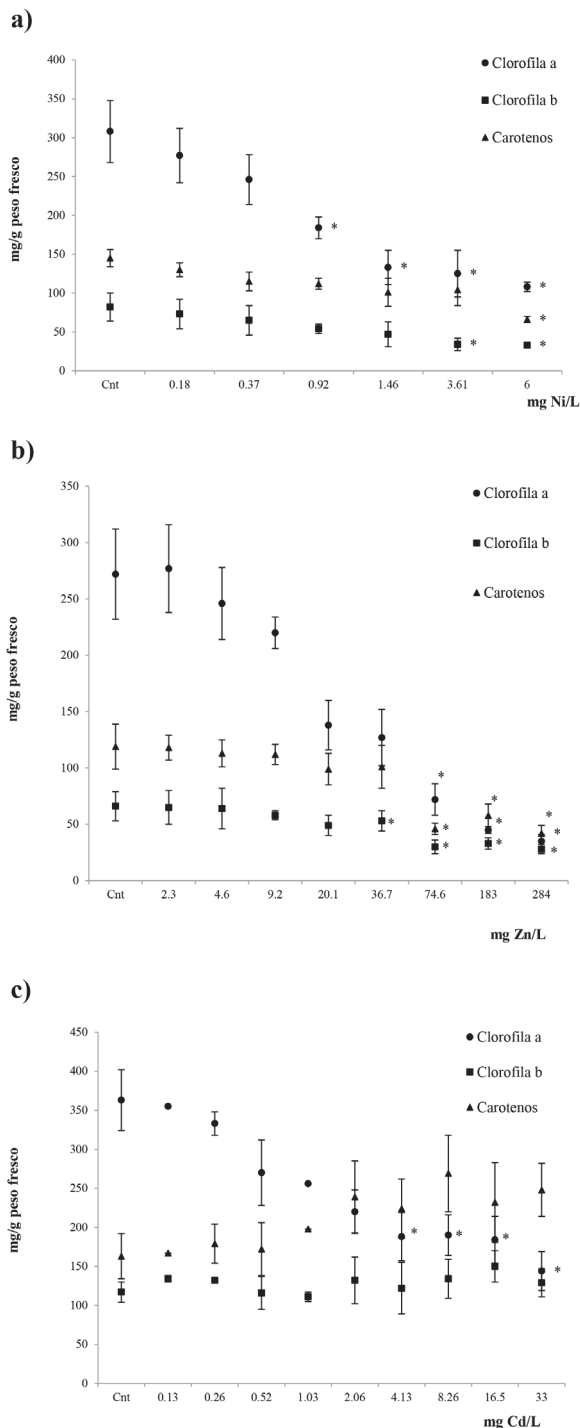


Figura 1. Efecto del Ni (a) Zn (b) y Cd (c) sobre pigmentos fotosintéticos de *L. gibba*. * Diferencias significativas respecto al control, ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$). *Effects of Ni (a), Zn (b) and Cd (c) on photosynthetic pigments of L. gibba.* * Significant difference from the control, ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$).

con el aumento de las concentraciones de exposición. Respecto a la acción sobre los ejes longitudinal y transversal de las frondes, se observó una disminución significativa de los mismos a partir de 0.92 mg/L, respecto a las longitudes de las frondes consideradas controles (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). Como en el caso del área de las frondes, se observó una respuesta dependiente de las concentraciones de Ni. Entre los caracteres morfométricos evaluados, el área de la fronde fue el que evidenció efectos adversos a una menor concentración de exposición al Ni.

Se realizó una evaluación de la modificación del número de frondes por colonia mediante la relación frondes/colonias. No se observó una disminución significativa de esta proporción, sino que este valor permaneció similar al control y ninguna de las concentraciones difirió significativamente del mismo (ANOVA y test de Dunnett $p > 0.05$) (Tabla 1). En concordancia, se observó al finalizar el ensayo que las colonias no estaban desagregadas, sino que las frondes se mantuvieron unidas aún en las concentraciones mayores.

En cuanto a la observación macroscópica con el fin de detectar efectos visibles, las plantas expuestas a Ni mantuvieron un verde intenso similar al color de las del control, independientemente de la concentración de exposición.

Analizando la acción de este metal sobre el contenido de pigmentos, se observó una disminución, tanto para las clorofilas *a* y *b* como para los carotenoides respecto del control (Fig. 1a). El contenido de clorofila *a* de las plantas expuestas a partir de 0.92 mg Ni/L en adelante difirió significativamente del control (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). El contenido de clorofila *b* fue significativamente menor en los tratados con 3.61 y 6 mg Ni/L. En el caso del contenido total de carotenoides, se observó una disminución significativa en aquellas plantas expuestas a la concentración más alta, 6 mg Ni/L.

Este fenómeno se ha observado en las especies de *Spirodela polyrhiza* y *Lemna minor* expuestas a un rango de concentraciones de Ni similares, ya que presentaron una disminución en el contenido de los pigmentos fotosintéticos, resultando especialmente sensible el contenido de clorofila *a* (Appenroth *et al.*, 2010). Estos autores informan que el sistema tilacoidal resultó muy afectado por

el tratamiento con este metal, sobre todo por la presencia de gránulos de almidón en los cloroplastos. Mencionan que no hay registros de que un tratamiento con Ni genere una estimulación en el proceso de fotosíntesis, y que, por lo tanto, la acumulación de almidón sería una consecuencia de una inhibición del crecimiento debido a una menor demanda de carbohidratos. Estos autores observaron que el contenido de almidón disminuye a concentraciones elevadas del metal como las empleadas aquí, lo cual podría deberse a una inhibición importante en la producción fotosintética lo que llevaría a una menor acumulación de almidón. Por lo tanto, la acumulación de gránulos de almidón sería una consecuencia inicial de la acción del nickel, para luego, observarse una disminución de su acumulación, por acciones negativas sobre la fotosíntesis frente a concentraciones más elevadas de este metal.

Zinc

Los efectos del Zn sobre los parámetros morfométricos analizados se observan en la Tabla 1. Al analizar el área total, se observó que todas las concentraciones de exposición, excepto la menor, provocaron una disminución significativa respecto al control (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). A partir de la concentración 4.6 mg/L se vio una respuesta dependiente de la concentración donde el valor del área total disminuyó en función del aumento de la concentración de exposición. Al analizar el eje longitudinal total, se observó que su valor disminuyó a medida que incrementó la concentración de exposición a partir de la concentración 4.6 mg/L, siendo esta disminución significativa a partir de 9.2 mg/L (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). En la menor concentración de exposición de 2.3 mg/L, dicho valor fue ligeramente mayor pero no estadísticamente significativa respecto al control (Tabla 1). Los ejes transversales disminuyeron significativamente a medida que se incrementó la concentración de exposición a partir de la concentración 4.6 mg/L. Este parámetro morfométrico fue más afectado que el eje longitudinal, ya que la menor concentración a la cual se detectaron efectos significativos fue 4.6 mg/L, es decir menor a la observada para el eje longitudinal.

Con respecto a la evaluación de la desintegración de las colonias, se observó un aumento no significativo en la relación frondes/colonias en las tres menores concentraciones estudiadas con respecto al control (Tabla 1). A partir de la concentración 20.1 mg/L, esta relación disminuyó a medida que aumentaron las concentraciones de exposición, siendo un indicador de la tendencia hacia colonias con menos frondes como respuesta a mayor contenido de Zn en el medio. Esta disminución fue significativa a partir de concentraciones de exposición igual y mayores a 74.6 mg/L (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$).

Con respecto a la evaluación macroscópica de las plantas expuestas a Zn, se observó una clorosis importante en las plantas expuestas a las dos mayores concentraciones, ya que presentaron un color blanquecino.

En cuanto al contenido de pigmentos, se observó una disminución significativa de las clorofilas *a* y los carotenoides, en las plantas expuestas a concentraciones igual y mayores a 74.6 mg/L respecto al control. Para la clorofila *b* esta disminución fue significativa a partir de 36.7 mg/L (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$) (Fig. 1b). Ha sido propuesto que el Zn se acumula preferentemente en cloroplastos, donde puede interactuar directamente con las membranas tilacoides (Upadhyay et al., 2017). La marcada disminución observada de los pigmentos fotosintéticos en las plantas expuestas a Zn, el cual fue mayor que para el caso de los demás metales evaluados, respalda esta hipótesis. Parlak & Yilmaz (2012), observaron para la especie *L. gibba* que el contenido de clorofila *a*, *b* y carotenoides fue disminuido significativamente respecto al control por un tratamiento con 1.5 mg Zn/L durante 7 días. Los autores plantean que esta disminución podría estar atribuida a la inhibición inducida por este metal de la biosíntesis de clorofila a nivel de los cloroplastos.

Cadmio

El análisis de los resultados permitió concluir que los caracteres morfométricos fueron afectados en función del aumento de las concentraciones de exposición del Cd (Tabla 1). Al analizar el área total, se observó para todas las concentraciones, con ex-

Tabla 1. Acción de los metales estudiados sobre características morfológicas de *L. gibba*. Valores expresados en mm². Media de tres réplicas. Desviación típica entre paréntesis. *Effects of metals on morphological characteristics of L. gibba. Values in mm². Mean of three replicates. Standard deviation in brackets.*

Conc. (mg/L)	Área	Eje Long.	Eje Trans.	Relación Frondes/colonias
Ni				
Cnt	232.4 (±40.4)	122 (±15)	105.5 (±9.78)	3.8
0.18	196.7 (±18.7)	109.5 (±9.22)	101.8 (±6.64)	3.6
0.37	165.2* (±0.05)	95.04 (±0.42)	85.85 (±3.57)	2.7
0.92	133.5* (±3.4)	70.68* (±6.53)	55.91* (±5.16)	3.8
1.46	121.6* (±35.5)	61.78* (±15.1)	49.67* (±13.33)	4
3.61	93.93* (±1.29)	48.73* (±0.14)	39.15* (±0.58)	4.5
6	90.84* (±8.76)	46.17* (±5.99)	36.68* (±5.86)	4
11.82	78.02* (±1.5)	40.14* (±0.4)	30.56* (±0.23)	3
Zn				
Cnt	218.9 (±25.1)	122.1 (±14)	110.7 (±13.4)	3.7
2.3	234.7 (±12)	136.5 (±4.3)	122.1 (±4.6)	4.2
4.6	152.6* (±16.8)	94.23 (±11.5)	82.2* (±10.7)	4.7
9.2	152.2* (±10)	88.01* (±5)	77.01* (±3)	4.3
20.1	139.2* (±21)	77.92* (±8)	69.4* (±10.4)	2.4
36.7	148.4* (±0.8)	78.44* (±2.3)	68.1* (±1)	2.6
74.6	129.1* (±4.3)	69.18* (±3.6)	60.7* (±7.1)	2.3*
183	104.7* (±19.8)	48.28* (±10)	44.01* (±6.4)	1.3*
284	88.43* (±4.9)	42.57* (±0.8)	35.1* (±1)	1.5*
587	72.23* (±14.2)	35.98* (±3.4)	29.3* (±3.9)	1.1*
Cd				
Cnt	201 (±22.5)	119 (±13.8)	104 (±12)	4.6
0.13	171 (±6.4)	104 (±4)	84.8* (±8.09)	3.8
0.26	163* (±17.4)	110 (±6.2)	85.8* (±3.42)	3.1*
0.52	152* (±6.8)	107 (±2.3)	86.2* (±3.48)	2.6*
1.03	157* (±3.5)	111 (±2.3)	92.4* (±0.75)	1.8*
2.06	130* (±0.03)	95* (±5.2)	76.78* (±4.49)	1.4*
4.13	114* (±4.9)	75* (±1.5)	59.9* (±0.39)	1.3*
8.26	123* (±4.1)	76* (±3.2)	59.4* (±2.3)	1.2*
16.5	92* (±9.5)	61* (±5.1)	46.9* (±3.9)	1.1*
33	65* (±9.9)	38* (±5)	28.7* (±3.91)	1*

* diferencia significativa respecto al control ANOVA y test de Dunnett ($p < 0.05$)

cepción de la menor (0.13 mg/L), que las plantas presentaron una disminución estadísticamente significativa en el área total con respecto al control (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). Al analizar el eje longitudinal total, se observó que el valor del eje longitudinal total disminuyó significativamente a partir de concentraciones igual y mayores a 2.06 mg/L. En cuanto al análisis del eje transversal total de las plantas expuestas 7 días a distintas concentraciones de Cd, se observó que hubo una disminución significativa en esta media ya desde la concentración menor de exposición de 0.13 mg/L.

El cálculo de la relación frondes/colonias de las plantas expuestas a Cd se observa en la Tabla 1. La evaluación de la modificación del número de frondes por colonia mostró una fuerte tendencia de desagregación de las plantas ya que este

índice disminuyó a medida que incrementó la concentración del metal en solución, dando como resultado colonias con un número cada vez menor de frondes. Para este parámetro, todas las concentraciones a excepción de la menor de 0.13 mg/L difirieron significativamente del control (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). En concordancia, se observó al finalizar el ensayo que, en la concentración más alta, las colonias estaban formadas únicamente por frondes aisladas. Los trabajos que incluyen mediciones de este parámetro son escasos; Li & Xiong (2004) trabajando con *L. paucicostata* expuesta a Cd, encontraron que este metal inducía el desprendimiento temprano de las colonias hijas en un proceso que podría estar desencadenado por una producción de cantidades anormales de etileno en la planta.

Como complemento al análisis recién descrito, se llevó a cabo una evaluación macroscópica de las plantas del ensayo. A partir de la concentración de 2.06 mg/L, se observó una importante cantidad de frondes con clorosis y una disminución general del color verde intenso. Las plantas expuestas a la máxima concentración presentaron en su totalidad un color marrón amarillento. Se observó una modificación de la gibosidad de algunas frondes y disminución de la longitud de las raíces incluso en bajas concentraciones. Una posible razón de este efecto podría deberse a un desbalance de óxido nítrico (NO), ya que se ha establecido que esta molécula actúa como mensajero en las plantas debido a su relativa estabilidad y facilidad para traspasar las membranas biológicas (Griffiths, 2005), la cual en respuesta al Cd puede actuar como una molécula deletérea que media en los efectos tóxicos del Cd como por ejemplo en la inhibición del crecimiento de las raíces como fue observado en *Arabidopsis* (Besson-Bard et al., 2009) y en trigo (Groppa et al., 2008).

El Cd produjo una alteración en el contenido de pigmentos. Se observó una disminución significativa en el contenido de clorofila *a* en todas las plantas tratadas con concentraciones iguales y mayores a 4.13 mg/L (ANOVA y test de Dunnett $p < 0.05$). (Fig. 1c). Respecto al contenido de clorofila *b*, estas diferencias no fueron significativas (ANOVA y test de Dunnett $p > 0.05$). La misma tendencia, pero incluso más marcada, pudo observarse para el contenido de carotenoides totales, con diferencias estadísticamente no significativas (ANOVA y test de Dunnett $p > 0.05$). El aumento en el contenido de este pigmento que se ha detectado en otros estudios, podría ser una respuesta frente al estrés oxidativo generado por parte del metal, ya que existe evidencia de la acción protectora de los mismos contra las especies reactivas del oxígeno (EROs) (Swapnil et al., 2021). Existen evidencias que el Cd tiene un efecto inhibitorio en la asimilación de Nitrógeno (Gallego et al., 2012). La disminución observada en el contenido de clorofila *a* en los distintos tratamientos con Cd podría deberse a un déficit nutricional de nitrógeno, el cual es un componente importante en el anillo de porfirina constituyente de estos pigmentos. La pérdida de pigmentación observada también podría explicarse por la alta movilidad del Cd en

Tabla 2. Índices de toxicidad (mg/L) a los 7 días de exposición estimados en base a número de frondes (NF) y área (A). *Toxicity threshold values (mg/L) at 7 days of exposure based on frond number (NF) and area (A).*

	Ni		Zn		Cd	
	NF	AT	NF	AT	NF	AT
IC50	2.54 (1.39-4.69)	2.39 (2.21-2.79)	76.73 (54.32-111)	137 (66-295)	17.8 (14.8-22.3)	10.9 (10.19-11.78)
NOEC	0.37	0.18	9.2	2.3	1.03	0.13
LOEC	0.92	0.37	20.1	4.6	2.06	0.26

() Intervalo de confianza 95%

el floema, por lo que este metal podría acumularse en cualquier parte de la planta causando crecimiento reducido y clorosis (Gallego et al., 2012). Además, hay evidencias que este metal altera la ultraestructura de los cloroplastos y reduce la tasa neta fotosintética (Souza et al., 2011).

Índices de toxicidad

Con el fin de analizar la acción de los tres metales estudiados sobre *Lemna gibba* se estimaron distintos índices de toxicidad en base al número de frondes y al área total (Tabla 2). En el caso del Ni se observó que el valor de IC50 fue 2.39 mg/L (2.21-2.79) para el área total, con un valor similar de IC50 = 2.54 mg/L (1.39-4.69) cuando se calculó a partir del efecto sobre el número de frondes. Los índices NOEC y LOEC estimados basándose en el área total resultaron menores a los estimados usando el número de frondes, indicando una mayor sensibilidad del parámetro área total para identificar efectos a largo plazo (Tabla 2).

Existen antecedentes bibliográficos relacionados a la variación de las concentraciones de este metal toleradas por dicha especie. Khellaf & Zerdaoui (2010) observaron una reducción de 50 % del área foliar de las frondes de plantas de la misma especie expuestas durante 4 días a 0.75 mg Ni/L. En tanto, que Parnian et al. (2016) demostraron que *L. gibba* podía no solo sobrevivir sino también retirar el 50 % del Ni en el medio tras 14 días de exposición a 6 mg/L. Por otro lado, Yilmaz & Parlak (2011) observaron que *L.*

gibba es capaz de acumular y tolerar el Ni en un rango de concentraciones de 0.05 a 20 mg/L, en parte por un proceso de detoxificación de las especies reactivas del oxígeno mediante un sistema antioxidante eficiente.

Analizando los índices de toxicidad para el Zn, las concentraciones efectivas 50 estimadas basándose en ambos parámetros fueron muy diferentes, resultando menor el índice estimado usando el número de frondes por lo tanto más sensible en la valuación de la ecotoxicidad de este metal a corto plazo (Tabla 2). En forma similar a lo observado para el Ni, los índices NOEC y LOEC estimados basándose en el área total resultaron ser los más bajos, resultando un buen indicador en la detección de efectos a largo plazo (Tabla 2).

Respecto a los intervalos de tolerancia a este metal por parte de *L. gibba* registrado en la bibliografía, Megateli et al. (2009) evaluaron el número de colonias de esta especie en plantas expuestas a 4 y 50 mg Zn/L, observando una inhibición del crecimiento de las plantas expuestas de 50 y 79 % respectivamente. De igual manera, existen antecedentes bibliográficos que documentan el potencial de esta especie en la remoción de este metal, ya que se verificó una efectiva bioacumulación de Zn en concentraciones de 18 mg/L, a pesar de observarse una reducción en la biomasa respecto a los controles (Khellaf & Zerdaoui, 2009).

Los índices de toxicidad estimados para el Cd permitieron determinar que la IC50 en basándose en el área total fue menor que la estimada utilizando el número de frondes (10.9 y 17.8 mg/L, respectivamente) (Tabla 2). Los índices NOEC y LOEC estimados basándose en el área total resultaron menores a los estimados basándose en el número de frondes. De esta manera, como se ha mencionado para el Ni y Zn, el área total también resultó ser un buen indicador de los efectos a largo plazo, siendo, además, en el caso del Cd, un indicador de efectos a corto plazo (Tabla 2).

El rango de acción fue similar a los hallados en trabajos de retirada, como en Kaoud et al. (2011) donde se utilizaron plantas de la especie *L. gibba*, para retirar el metal del medio en un medio de cultivo con una concentración de 10 mg Cd/L. También Verma & Suthar (2015) observaron a la misma concentración, una retirada del 61.5 % de la carga inicial de metal por parte

de *L. gibba* en medio de cultivo con pH 7 luego de 7 días de exposición y un crecimiento (medido como ganancia de biomasa) de 44.4 % respecto al

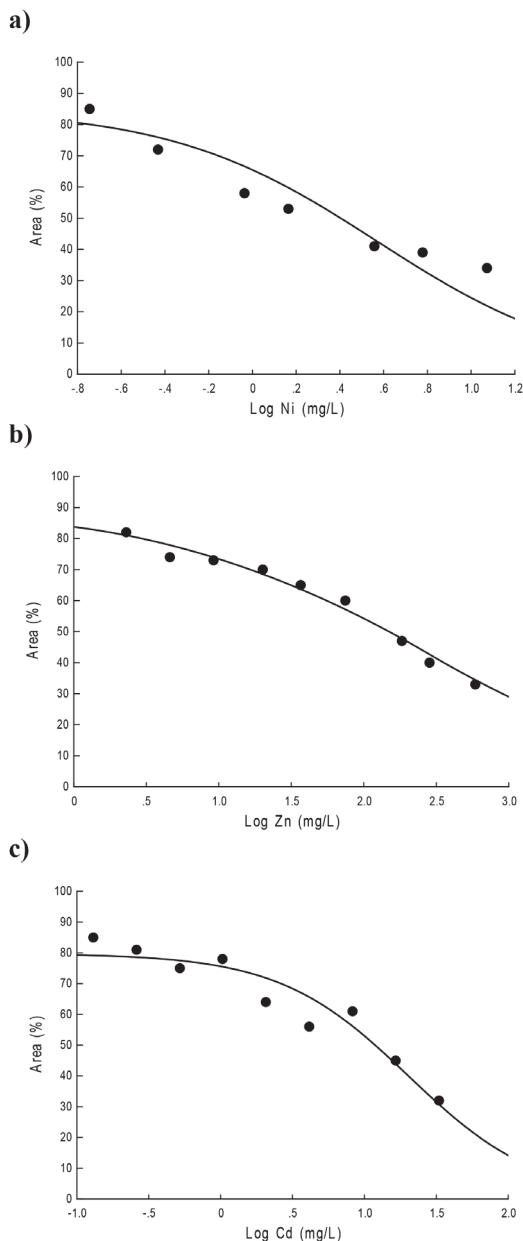


Figura 2. Acción de los gradientes de concentraciones de Ni (a) Zn (b) y Cd (c) sobre la disminución del área total de las frondes (% respecto al control) de *L. gibba* luego de 7 días de exposición. Frond total area (% respect to the control) of *L. gibba* as a function of the concentrations of Ni (a), Zn (b) and Cd (c) after seven days of exposure.

tiempo inicial, bajo las mismas condiciones.

El área total fue el parámetro que arrojó valores más bajos de los índices de toxicidad para evaluar efectos a largo plazo (NOEC y LOEC) para los tres metales estudiados, representando así un buen indicador de predicción de estos efectos. Este carácter morfométrico resultó el más sensible en la detección de efectos sobre *L. gibba*. Por tal motivo, se construyeron curvas de concentración respuesta con este parámetro a fin de contar con el espectro de acción tóxica para cada metal. Así, se observa que el área total disminuyó con el aumento del gradiente de las concentraciones para los tres metales, siendo más marcada esta acción para el Ni (Fig. 2a) en comparación con el Cd (Fig. 2c) y menos adversa para el caso del Zn (Fig. 2b).

Análisis integrado de los parámetros evaluados

Los ensayos realizados permitieron evidenciar un efecto fitotóxico por parte del Ni, Zn y Cd. Los procesos bioquímicos responsables de estos efectos estarían vinculados, por un lado, con la interacción directa de los metales con proteínas por su afinidad con distintos grupos funcionales, por otro lado, por la estimulación de generación de especies reactivas del oxígeno provocando estrés oxidativo (Sharma & Dietz, 2009). Por otra parte, se ha dicho que los metales pesados tienden a unirse a los grupos sulfidrilos de distintas enzimas y de esta manera suprimirían el funcionamiento de componentes biológicos esenciales, lo cual se evidencia en la toxicidad observada; mientras que además pueden provocar un desbalance iónico como resultado de una translocación alterada de iones como Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} (Yilmaz & Parlak, 2011). Como fue mencionado con anterioridad, la toxicidad observada también puede deberse a especies reactivas del oxígeno (EROs) que pueden ser producidas por estrés por metales. Dicha toxicidad podría ser causada por una proteólisis desmedida que ha sido asociada al estrés oxidativo promovido por EROs (Palma et al., 2002). También, se ha reconocido últimamente que los EROs en las plantas realizan funciones esenciales en diversos procesos como el crecimiento, desarrollo aclimatación al ambiente y establecimiento de resistencia ante patógenos (Mullineaux et al., 2008). Un desbalance en la producción o

regulación de estas especies químicas es factible que conlleve a trastornos en los procesos recién mencionados. Al representar hasta más del 50 % del peso seco de las células, las proteínas son biomoléculas con muchas posibilidades de reaccionar con estos EROs, de manera que pueden sufrir daño oxidativo (Pena et al., 2012). Se ha mencionado en este sentido que los aminoácidos más susceptibles de ser atacados por oxidantes son aquellos que contienen cadenas laterales aromáticas, cíclicas o con tioles, donde el sulfuro incrementa su valencia para estabilizar el radical intermedio. Incluso hasta los aminoácidos menos reactivos son capaces de reaccionar frente a algunos radicales como el hidroxilo, resultando en una oxidación de la mayoría de sus cadenas laterales (Griffiths, 2005). Entre los efectos de oxidación de las proteínas causados por radicales puede ocurrir frecuentemente la introducción de nuevos grupos funcionales en las cadenas laterales de los aminoácidos. Esto contribuye en la alteración de las funciones y el recambio de las mismas, formarse oxoácidos y aldehídos (Griffiths, 2005, Pena et al., 2012). Distintos factores de estrés abiótico, como metales, son causantes de cierre estomático provocando una limitación en el suministro de CO_2 para la fotosíntesis. Bajo estas condiciones, los cloroplastos pueden volverse una fuente principal de EROs por un lado por fotorespiración mediante el proceso de reciclado de fosfoglicolato formado por la reacción de oxigenación de la Rubisco, la cual lleva a una producción sustancial de H_2O_2 por una glicolato oxidasa localizada en el peroxisoma y por otro lado por el proceso que involucra la reacción de Mehler, la cual implica la reducción del oxígeno molecular, hasta superóxido y peróxido de hidrógeno, por los electrones de la cadena de transporte electrónico fotosintético en el fotosistema I (Mullineaux et al., 2008).

La disminución en los valores de los parámetros morfométricos observadas bajo el estrés por los metales podría estar explicado por lo observado por Pena et al. (2012). Estos autores estudiaron el efecto del Cd y H_2O_2 sobre el trigo sugiriendo que el estrés primero bloquea rápidamente la progresión del ciclo celular, presumiblemente para prevenir que las células entren en estadios donde son particularmente vulnerables al daño, y permite que el sistema de defensa celular se mantenga ac-

tivado. Dicho bloqueo decrecería la proliferación celular mediante la regulación negativa de estimuladores de la división celular, como una pérdida de funcionalidad de un complejo ciclina D-CDK (Pena *et al.*, 2012). Por otro lado, Chaoui *et al.* (1997) plantearon que las peroxidasas podrían estar involucradas en la lignificación de las paredes celulares como una adaptación mecánica a condiciones de estrés, proceso que afectaría la plasticidad celular limitando la elongación correcta de las células y por lo tanto afectando el tamaño de las frondes; en dicho trabajo relacionan una actividad exacerbada de la enzima GPOX con una limitación en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* bajo tratamientos con 0.6 mg Cd/L o 6.5 mg Zn/L. En lineamiento con lo mencionado, este estudio podría arrojar un efecto similar, dado que en las concentraciones donde se observó disminución en el área total no hubo reducción en el número de frondes. De esta manera, podría suponerse que las frondes hijas pudieron nacer, pero se vieron limitadas en el crecimiento posterior. Además, ha sido mencionado que las propiedades elásticas de las paredes celulares pueden verse afectadas en diferente grado por diferentes metales, donde un incremento de la rigidez de la pared celular puede ser causa de trastornos enzimáticos en la biosíntesis de constituyentes de la pared, cambios en el ensamblaje de los polímeros de la pared, cambios de disposición de los microtúbulos o a un aumento de la adhesión celular de la lámina media (Barceló & Poschenrieder, 1992). Por otra parte, se observó un efecto estimulador de los caracteres morfométricos en las plantas expuestas a la menor concentración de Zn de 2.3 mg/L. Esta respuesta podría explicarse por el aumento de la biodisponibilidad de este micronutriente esencial, lo que ayudaría al correcto funcionamiento de la fisiología cuando estos no alcanzan valores tóxicos. Además, un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes podría ser suficiente para contrarrestar el poder oxidante inducido por estrés en este caso (Martinez, 2019).

Tanto el Cd como el Zn tuvieron un efecto de desagregación de las colonias. Se ha propuesto que el proceso de abscisión de las frondes en *Lemna* es un proceso activo facilitado por células secretoras en los estípites que conectan las frondes hijos de los parentales (Topp *et al.*, 2011). Se demostró en ese mismo trabajo que iones Ag^+ accele-

ran el proceso sin modificar el mecanismo. En el presente trabajo, los cationes presentes de Cd y Zn podrían afectar de manera similar el proceso de liberación. Por otro lado, el Ni no mostró este efecto sobre las plantas expuestas, probablemente por no causar algún efecto sobre las células que participan en la separación de las células hijas.

La acción sobre la desagregación de las colonias también se ha observado en estudios realizado con plantas expuestas a los plaguicidas Glifosato y Togar (Sáenz *et al.*, 2007, Sáenz *et al.*, 2011, Sáenz *et al.*, 2013). De esta manera, esta respuesta podría ser utilizada ambientalmente como un indicador de estrés de las plantas frente a la presencia de contaminantes, no siendo exclusiva de la acción de metales.

En cuanto a la evaluación de los pigmentos, en general, se observó una disminución del contenido de pigmentos para los tres metales con excepción de la clorofila *b* y total de carotenos para el Cd. Se ha mencionado que la destrucción de los pigmentos fotosintéticos por metales puede deberse a un deterioro en la cadena transportadora de electrones, reemplazo de los iones Mg^{2+} asociados al anillo tetra pirrólico de las moléculas de clorofila, inhibición de enzimas importantes asociadas a la biosíntesis de clorofila o a procesos de peroxidación de los lípidos de la membrana de los cloroplastos por especies reactivas de oxígeno (Upadhyay *et al.*, 2017). A pesar de que algunos estudios han reportado que concentraciones elevadas de metales pesados como el níquel pueden causar efectos de clorosis o necrosis, estos efectos no se observaron en las plantas expuestas a las mayores concentraciones de este metal (Ashraf & Mehmood, 2013; Hassan *et al.*, 2019).

Sobre la base de los resultados obtenidos podemos concluir que las características morfométricas de las frondes junto con la relación frondes/colonias de *L. gibba* podría ser utilizado en la detección temprana de efectos de metales pesados sobre este grupo de macrófitas fundamentales por su función en ambientes dulceacuícolas, en particular, los sistemas acuáticos bonaerenses.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, A., Saez, J.M., Davila Costa, J.S., Collin, V.L., Fuentes, M.S., Cuzzo, S.A., Beni-

- meli, C.S., Polti, M.A., Amoroso M.J. (2017). Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere*, 166, 41-62. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.070
- APG (The Angiosperm Phylogeny Group). (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105–121. DOI: 10.1111/boj.12385
- APHA-AWWA-WPCF. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. Clesceri (ed), Greenberg and Trussell 19^o edition, Washington, USA.
- Ashraf M, Mehmood S (2013). Response of different tomato cultivars to nickel stress: growth, leaf pigments and photosynthetic parameters. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(9), 2637-2645. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6
- Appenroth, K.J., Krech, K., Keresztes, Á., Fischer, W. & Koloczek, H. (2010). Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere*, 78 (3), 216–223. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.11.007
- Barceló, J. & Poschenrieder, C. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta*, 2, 345-361.
- Belgers, J.D.M., Van Lieverloo, R.J., Van der Pas, L.J.T. & Van den Brink, P.J. (2007). Effects of the herbicide 2,4-D on the growth of nine aquatic macrophytes. *Aquatic Botany*, 86, 260-268. DOI: 10.1016/j.aquabot.2006.11.002
- Besson-Bard, A., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C., Gaymard, F., Taconnat, L., Renou, J.P., Pugin, A., Wendehenne, D. (2009). Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology*, 149, 1302-1315. DOI: 10.1104/pp.108.133348
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H & Ferjani, E.E. (1997). Cadmium and zinc induction of peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 127, 139-147. DOI: 10.1016/S0168-9452(97)00115-5
- Chen, P. C., Crawford-Brown, D., Chang, C. H., & Ma, H. W. (2014). Identifying the drivers of environmental risk through a model integrating substance flow and input–output analysis. *Ecological economics*, 107, 94-103. DOI: 10.1016/j.ecolecon.2014.08.002
- Chorom, M., Parnian, A. & Jaafarzadeh, N. (2012). Nickel Removal by the Aquatic Plant (*Ceratophyllum demersum* L.). *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(4), 372-375. DOI: 10.7763/IJESD.2012.V3.250
- Di Marzio W.D. & Sáenz M.E. (2013). *Ecotoxicología*. EUDEBA, ISBN: 9789502320960. Buenos Aires. 300 pp. <https://www.eudeba.com.ar/Papel/9789502320960/Ecotoxicología>
- Diovisalvi, N., Berasain, G., Unrein, F., Colautti, P., Fermani, M. E., Llames, A.M., Torremorell, L., Lagomarsino, G., Pérez, R., Escaray, J., Bustingorry, M., Ferraro, H.E., Zagarese. (2010). Chascomús: estructura y funcionamiento de una laguna pampeana turbia. *Ecología Austral*, 20,115-127. https://ojs.ecologiaaustral.com.ar/index.php/Ecologia_Austral/article/view/1314
- Dogan, M., Karatas, M. & Aasim, M. (2018). Cadmium and lead bioaccumulation potentials of an aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L.: a laboratory study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 431-440. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.10.058
- Doğanlar, Z.B. (2013). Metal accumulation and physiological responses induced by copper and cadmium in *Lemna gibba*, *L. minor* and *Spirodela polyrhiza*. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 25 (2), 79-88. DOI: 10.3184/095422913X13706128469701
- Fernández, P.M., Viñarta, S.C., Bernal, A.R. & Cruz, E.L. (2018). Bioremediation strategies for chromium removal: Current research, scale-up approach and future perspectives. *Chemosphere*, 208, 139-148. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.166
- Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Iannone, M.F., Rosales, E.P., Zawoznik, M.S., Groppa, M.D., Benavides, M.P. (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental*

- Botany*, 83, 33-46. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2012.04.006
- Griffiths, H.R. (2005). Chemical Modifications of Biomolecules by Oxidants. *Handbook Environmental Chemistry*, 2, 33-62. DOI: 10.1007/b101145
- Groppa, M.D., Rosales, E.P., Iannone, M.F., & Benavides, M.P., (2008). Nitric oxide polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry*, 69, 2609-2615. DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.07.016
- Häder, D. P., Banaszak, A. T., Villafañe, V. E., Narvarte, M. A., González, R. A., & Helbling, E. W. (2020). Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. *Science of the Total environment*, 713, 136586. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.136586
- Hassan, M.U., Chattha, M.U., Khan, I., Chattha, M.B., Aamer, M., Nawaz, M., Ali, A., Khan, M.A.U., Khan, T.A. (2019). Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities-a review. *Environmental Sciences Pollution and Research International*, 26(13), 12673-12688. DOI: 10.1007/s11356-019-04892
- Harguinteguy, C.A., Fernández Cirelli, A. & Pignata, M.L. (2014). Heavy metal accumulation in leaves of aquatic plant *Stuckenia filiformis* and its relationship with sediment and water in the Suquia river (Argentina). *Microchemical Journal*, 114, 111-118. DOI: 10.1016/j.microc.2013.12.010
- Kaoud, H.A., Zaki, M.M., El-Dahshan, A.R., Saeid, S. & El Zorba, H.Y. (2011). Amelioration the toxic effects of cadmium-exposure in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by using *Lemna gibba* L. *Life Science Journal*, 8(1), 185-195. DOI: 10.7537/marslsj080111.26
- Khellaf, N., & Zerdaoui, M. (2009). Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant, *Lemna gibba* L. *Bioresource Technology*, 100 (23), 6137-6140. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.06.043
- Khellaf, N., & Zerdaoui, M. (2010). Growth response of the duckweed *Lemna gibba* L. to copper and nickel phytoaccumulation. *Ecotoxicology*, 19(8), 1363-1368. DOI: 10.1007/s10646-010-0522-z
- Kumar, R., Mishra, R.K., Mishra, V., Qidwai, A., Pandey, A., Shukla, S.K., Pandey, M., Pathak, A., Dikshit, A. (2016). Detoxification and tolerance of heavy metals in plants. In: A. Pandey (ed.). *Plant Metal Interaction*. (pp. 335-359). Elsevier, Amsterdam. DOI: 10.1016/B978-0-12-803158-2.00013-8
- Landolt, E., & Zarzycki, K. (1994). Ecological field investigations of duckweed (Lemnaceae) in Argentina. *Berichte des Geobotanisch Institute der ETH*, Stiftung Rübel Zürich 60, 62-109, f. 1-12.
- Li, J.L., Zhang, C.X., Wang, Y.X., Liao, X.P., Yao, L.L., Liu, M., & Xu, L. (2015). Pollution characteristics and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in groundwater at Xiaodian Sewage Irrigation Area, Taiyuan City. *Huanjing Kexue. Environmental Sciences*, 36, 172-178. DOI: 10.13227/j.hjcx.2015.01.022
- Li, T.Y., & Xiong, Z.T. (2004). Cadmium-induced colony disintegration of duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) and as biomarker of phytotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(2), 174-179. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2003.11.007
- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Method in Enzymology*, 148, 350-382. DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1
- Martinez, R.S. (2019). Evaluación ecotoxicológica de metales sobre macrófitas acuáticas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. 375 pp. DOI: 10.35537/10915/74492
- Megateli, S., Semsari, S., & Couderchet, M. (2009). Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper and zinc) by *Lemna gibba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6), 1774-1780. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2009.05.004
- Mullineaux, M.P., Karpinski, S. & Creissen, G.P. (2008). Integration of Signaling in Antioxidant Defenses. In: B. Demmig-Adams et al. (eds.). *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment*. (pp.223-239). Springer Science Business Media B.V. ISBN 978-1-4020-3579-1.
- Nordberg, G., Fowler, B.A., Nordberg, M., & Friberg, L.T. (2007). Introduction-General

- Considerations and International Perspectives. In: G. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg & L.T. Friberg (eds.). *Handbook on the toxicology on metals*. (pp. 1-9). Academic Press, Cambridge, UEA. DOI: 10.1016/B978-012369413-3/50056-2
- OECD. (2006). Guidelines for the testing of chemicals 221 - *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. DOI: 10.1787/9789264016194
- Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., & del Río, L.A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 521-530. DOI: 10.1016/S0981-9428(02)01404-3
- Parlak, K.U. & Yilmaz, D.D. (2012) Response of antioxidant defences to Zn stress in three duckweed species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 85, 52-58. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.08.023
- Parnian, A., Chorom, M., Jaafarzadeh, N., & Dinavand, M. (2016). Use of two aquatic macrophytes for the removal of heavy metals from synthetic medium. *Ecotoxicology and Hydrobiology*, 16, 194-200. DOI: 10.1016/j.ecohyd.2016.07.001
- Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Méndez, A.A.E., & Gallego, S.M. (2012). Oxidative post translational modifications of proteins related to cell cycle are involved in cadmium toxicity in wheat seedlings. *Plant Science*, 196, 1-7. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.07.008
- Quiros, R., A., Rennella, M. Boveri, J., Rosso J., & Sosnovsky A. (2002). Factores que afectan la estructura y el funcionamiento de las lagunas pampeanas. *Ecología Austral*, 12, 175-185. https://ojs.ecologiaaustral.com.ar/index.php/Ecologia_Austral/article/view/1556
- Ringuelet, R. A. (1972). Ecología y biocenología del habitat lagunar o lago de tercer orden de la región Neotrópica Templada (Pampasia sudoriental de la Argentina). *Physis*, Tomo XXXI, 82, 55-76. <http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20111121009711>
- Rodriguez Capítulo, A., Paggi, A.C., & César, C. (1995). Composición del zoobentos de la laguna de lobos, Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Limnética*, 11(1), 29-37
- Rodríguez J. (2016). *Ecología*. Comercial Grupo ANAYA, SA. ISBN: 978-84-368-3597-7.
- Romanelli, A. & Massone, H.E. (2016). Desarrollo de indicadores ambientales e índice de calidad de lagos someros pampeanos de Argentina con alta intervención antrópica. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 7 (6), 123-137. <http://www.revistatyc.org.mx/ojs/index.php/tyca/article/view/1286>
- Ronderos, R. A., Bulla, L.A., & Grosso, L.E. (1968). Estudio comparativo del pleuston en cuatro lagunas de la provincia de Buenos Aires. *Revista del museo La Plata*, 10, 225-259. ISSN - 2545-6377.
- Sáenz, M.E., Di Marzio, W.D., Alberdi, J.L., & Curieses, S.P. (2013). Genotoxicidad de suelos contaminados con metales". Congreso de Ciencias Ambientales – COPIME. CABA, Bs As. Argentina.
- Sáenz, M.E., Di Marzio, W.D., & Alberdi, J.L. (2011). Ecotoxicity of herbicide Glyphosate used in tolerant transgenic soybean cultivation in Pampasic Region (Argentina) to aquatic macrophyte and microalgae. SETAC EUROPA, Milano, Italia.
- Sáenz, M.E., Di Marzio, W.D., Alberdi, J.L., & Tortorelli, M.D.C. (2007). Evaluación ecotoxicológica de un herbicida hormonal sobre productores primarios. SETAC LA Uruguay.
- Sanliyüksel Yucel, D., Balci, N., & Baba, A. (2016). Generation of acid mine lakes associated with 718 abandoned coal mines in Northwest Turkey. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 757-782. DOI: 10.1007/s00244-016-0270-z
- Seenivasagan, R., Karthika, A., Kalidoss, R., & Malik, J. A. (2022). Bioremediation of Polluted Aquatic Ecosystems Using Macrophytes. In: *Advances in Bioremediation and Phytoremediation for Sustainable Soil Management: Principles, Monitoring and Remediation* (pp. 57-79). Cham: Springer International Publishing. DOI: 10.1007/978-3-030-89984-4_1
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M. & Pinelli, E. (2014). Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, 232, 1-44. DOI: 10.1007/978-3-319-06746-9_1

- Sharma, S.S., & Dietz, K.J. (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Sciences*, 14, 43-50. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.10.007
- Souza, V.L., de Almeida, A.A.F, Lima, S.G.C., Cascardo, J.C.M., Silva, D.C., Mangabeira, P.A.O., & Gomes, F.P. (2011). Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). *Biometals*, 24, 59-71. DOI: 10.1007/s10534-010-9374-5
- Swapnill, P., Meena, M., Singh, S.K., Dhuldhaj, U.P., & Marwal, H.A. (2021). Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects. *Current Plant Biology*, 26. DOI: 10.1016/j.cpb.2021.100203
- Thomaz, S.M., & Cunha, E.R. (2010). The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages' composition and biodiversity. *Acta Limnológica Brasiliensia*, 22(2), 218-236. DOI: 10.4322/actalb.02202011
- Topp, C., Henke, R., Keresztes, Á., Fischer, W., Eberius M., & Appenroth, K.J. (2011). A novel mechanism of abscission in fronds of *Lemna minor* L. and the effect of silver ions. *Plant biology*, 13 (3), 517-523. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00394
- Upadhyay, R., Sharma, Y.K., & Srivastava, S. (2017). Effects of Zinc Stress on Growth, Photosynthetic Pigments, Antioxidative Enzymes and Protein Content of Black Gram. *Journal of Plant Physiology and Pathology*, 5, 2. DOI: 10.4172/2329-955X.1000166
- Verma, R., & Suthar S. (2015). Lead and Cadmium removal from water using duckweed – *Lemna gibba* L.: Impact of pH and initial metal load. *Alexandria Engineering Journal*, 54 (4), 1297-1304. DOI: 10.1016/j.aej.2015.09.014
- Volpedo, A. & Fernández Cirelli, A. (2013). El Lago Chasicó: similitudes y diferencias con las lagunas pampásicas. *Augmdomus*, 5, 1-18. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/29982>
- West, Inc & D. D, Gulley. (1996). TOXSTAT® V 3.5. Western Ecosystems Technology Inc. WY.
- Yang, J., Wang, Z., He, Z., Zhang, T., Gong, W., Chen, M., Qi, M., Coquet, P., Shum, P., Wei, L. (2021). High-Capacity Iron-Based Anodes for Aqueous Secondary Nickel–Iron Batteries: Recent Progress and Prospects. *ChemElectroChem*, (8)2, 274-290. DOI: 10.1002/celec.202001251
- Yilmaz, D.D., & Parlak, K.U. (2011). Nickel-induced changes in lipid peroxidation, antioxidative enzymes, and metal accumulation in *Lemna Gibba*. *International Journal of Phytoremediation*, 13 (8), 805-817. DOI: 10.1080/15226514.2010.525563
- Zhang, Z., Shi, W., Ma, H., Zhou, B., Li, H., Lu, C., & He, J. (2020). Binding Mechanism Between Fulvic Acid and Heavy Metals: Integrated Interpretation of Binding Experiments, Fraction Characterizations, and Models. *Water, Air & Soil Pollution*, 231, 184. DOI: 10.1007/s11270-020-04558