

UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA

ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRÍA EN QUÍMICA DEL MEDIO AMBIENTE



BIOACUMULACIÓN DE SELENIO EN *Bacopa monnieri* L. (HISOPO DE AGUA) BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO. AREQUIPA, 2015.

Tesis presentada por el Bachiller:

JOEL LUCIO MAMANI LÓPEZ

Para optar el grado académico de Maestro
en Química del Medio Ambiente

Arequipa, Perú

2016

AGRADECIMIENTOS

A dios por derramar sus bendiciones y dirigirme por buen camino, superando así los obstáculos en el transcurso de mi vida.

A mis padres que pusieron su apoyo y confianza en mí.

A la plana docente de la Maestría en Química del Medio Ambiente de la Universidad Católica Santa María por brindarme sus conocimientos y ayuda en momentos determinados.

A mis compañeros de la Maestría, especialmente a Derly, Elvis y Jeaneth por ser mis maestros, brindandome su apoyo incondicional y conocimientos necesarios para superarme como profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica por darme la oportunidad de estudiar esta maestría en modo presencial.

Gracias a todos por confiar y brindarme su apoyo, con ello voy superándome en mi formación profesional.

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	4
I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
1. RECOLECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL.....	6
2. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL <i>Bacopa monnieri</i> L.....	6
3. ESPECIE VEGETAL <i>Bacopa monnieri</i> L. (HISOPO DE AGUA).....	7
4. VALIDACIONES.....	12
5. BIOENSAYO DE TOXICIDAD	17
6. BIOACUMULACIÓN DE SELENIO.....	23
CONCLUSIONES	38
SUGERENCIAS	39
ANEXOS I.....	40
ANEXOS II.....	85
BIBLIOGRAFÍA.....	94

RESUMEN

El selenio es un oligoelemento no metálico presente en diversos sistemas ambientales, producto de la actividad antropogénica y natural; es bioacumulable, por lo que su concentración puede aumentar a través de la cadena trófica. La especie vegetal *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) fue recolectada de las lagunas del Santuario de Mejía, siendo las coordenadas de ubicación latitud 17° 08' 49" S 17, longitud 71° 51' 47" O y a una altitud de 13 m.s.n.m.; posteriormente se realizó la respectiva identificación en el HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, la cual consto que corresponde a dicha especie vegetal. La bioacumulación de selenio (IV) se realizó bajo sistema hidropónico por un periodo de 25 días; utilizando plántulas entre 5 y 7 cm que tuvieron 30 días de crecimiento, dos soluciones nutritivas de Hoagland de la Universidad Nacional Agraria de La Molina contaminados con selenito de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a concentraciones de a 5 mg.L^{-1} (T1) y 10 mg.L^{-1} (T2), y una solución nutritiva de Hoagland sin el contaminante (T0). Para realizar la cuantificación de selenio (IV) en hojas y raíces fue necesario realizar un proceso de digestión a microondas utilizando ácido nítrico y ácido clorhídrico en relación de 1:1.5; también se realizó una validación analítica por voltamperometría catódica de pulso diferencial utilizando la estación voltamperométrica (797 VA Computrace de Metrohm) que constaba de un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3 M. Como resultados de bioacumulación de selenio (IV), se obtuvo que a una concentración de 5 mg.L^{-1} la cantidad acumulada fue de $174.689 \pm 1.665 \text{ mg.Kg}^{-1}$ para raíces y $108.226 \pm 2.206 \text{ mg.Kg}^{-1}$ para hojas; y a una concentración de 10 mg.L^{-1} la cantidad acumulada fue de $282.935 \pm 1,695 \text{ mg.Kg}^{-1}$ para raíces y $90.067 \pm 0.640 \text{ mg.Kg}^{-1}$ para hojas. Según los resultados obtenidos, el potencial de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) para acumular selenio (IV) es mayor en raíces que en hojas.

Palabras claves: Selenio (IV), *Bacopa monnieri* L., Solución nutritiva de Hoagland, Bioacumulación, Voltamperometría.

ABSTRACT

The selenium is a no metallic trace element present in various environmental systems, product of anthropogenic and natural activity; it is bioaccumulative, so its concentration can increase through the food chain. The plant species (*Bacopa monnieri* L.) was collected from the lagoons of Mejia Sanctuary, being the location coordinates latitude 17° 08 '49 "S 17, length 71 ° 51' 47" W and height of 13 m.a.s.l.; then respective identification was carried out in the HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA) of the National University of San Agustín of Arequipa, which consist corresponding to said plant species. Bioaccumulation of selenium (IV) was performed under hydroponics system for a period of 25 days; using seedlings between 5 and 7 cm had 30 days of growth, two nutritious solutions Hoagland of the National Agrarian University of La Molina contaminated with sodium selenite pentahydrate ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) to concentrations of 5 mg.L⁻¹ (T1) and 10 mg.L⁻¹ (T2), and a Hoagland nutrient solution without contaminate (T0). For quantification of selenium (IV) in leaves and roots was necessary to make a microwave digestion process using nitric acid and hydrochloric acid in relation 1:1.5; an analytical validation is also performed by cathodic differential pulse voltammetry using the voltammetric station (Metrohm 797 VA Computrace) consisting of an electrode hanging mercury drop (HMDE), a platinum auxiliary electrode and a reference electrode Ag/AgCl/KCl 3 M. As a result of bioaccumulation of selenium (IV) was obtained that a concentration of 5 mg.L⁻¹ the accumulated amount was 174.689 ± 1.665 mg.Kg⁻¹ for roots and 108.226 ± 2.206 mg.Kg⁻¹ for leads, and a concentration of 10 mg.L⁻¹ was 282.935 ± 1.695 mg.Kg⁻¹ for roots and 90.067 ± 0.640 mg.Kg⁻¹ for leads. According to the results the potential of *Bacopa monnieri* L. (Water Hissop) to accumulate selenium (IV) is greater in roots than in leaves.

Keywords: Selenium (IV), *Bacopa monnieri* L., Hoagland nutrient solution, Bioaccumulation Voltammetry.

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos de la maestría en Química del Medio Ambiente es ensayar con microorganismos y plantas regionales para la biorremediación de suelos y lechos acuáticos contaminados. Teniendo en cuenta dicho objetivo se planteó en el presente trabajo de investigación que consistió en utilizar a *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) como una alternativa para bioacumular selenio de lechos acuáticos contaminados con dicho metal.

La problemática parte del vertimiento de efluentes procedente de las actividad agrícola, industrial y minera que se caracteriza por tener metales traza (Cu, Pb, Zn, Cr, Ni, Cd, As y Se) que son preocupantes debido a que alteran la calidad del agua y ecosistemas acuáticos [Simpson y Batley, 2007; Wang y Rainbow, 2008; Cai *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2013 y Wang *et al.*, 2015].

El selenio es considerado un oligoelemento no metálico que se encuentra de manera natural en el medio ambiente producto de erupciones volcánicas, erosión de rocas y suelos; sin embargo las actividades antropogénicas como la agricultura, minería, las centrales termoeléctricas, la quema de combustibles fósiles, la refinación del petróleo y minerales metálicos generan emisiones gaseosas y vertimiento de efluentes cuya composición química se presentan bajo la forma de óxidos de selenio (SeO_x), seleniuros (Se^{2-}), selenio elemental (Se^0), selenitos (SeO_3^{2-}) y selenatos (SeO_4^{2-}) [Laeuchli, 1993; Combs y Gray, 1998; USEPA, 1998; Sappington, 2002; Goh y Lim, 2004; Hamilton, 2004; Lemly, 2004; Navarro *et al.*, 2008; Fernández-Martínez y Charlet, 2009; Tuzen y Sari, 2010].

Por otro lado, el selenio en bajos niveles es un nutriente esencial para plantas y seres vivos, sin embargo el origen del problema es los altos niveles de selenio y su movimiento en el ambiente ya que puede bioacumularse en alimentos, peces y la vida silvestre acuática generando así un proceso de biomagnificación a través de la cadena trófica [Stadman, 1996; Tveitnes *et al.*, 1996; New South Wales Environmental Protection Agency, 1999; Jawaharlal Nehru University, 2000; Moscow Lomonosov State University, 2001 y Khan *et al.*, 2010]. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) establece como estándar de calidad ambiental $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ como criterio para la vida en lechos acuáticos [USEPA, 2014]. Para cumplir con estos estándares es necesario disminuir la concentración

de este metaloide de tal manera que no supere los estándares de calidad ambiental establecidos por la normativa legal vigente D.S. N° 015-2015-MINAM.

Actualmente existen estudios para mitigar los problemas de contaminación en agua originada por metales pesados, mediante estrategias basadas en el uso de plantas que tienen la propiedad de “bioacumular” metales pesados que consiste en la fitoextracción y fitoestabilización de metales pesados. Esta novedosa tecnología posee ventajas con respecto a otros métodos convencionales para el tratamiento de aguas residuales, ya que es una tecnología económica, de bajo costo y compatible con el ambiente [Clemens, 2001; Suresh y Ravishankar, 2004; LeDuc y Terry, 2005; Chehregani y Malayeri, 2007; Odjegba y Fasidi, 2007; Turan y Esringu, 2007; Lone *et al.*, 2008; Kawahigashi, 2009; Saier y Trevors, 2010; Kalve *et al.*, 2011; Sarma, 2011; Singh y Prasad, 2011; Vithanage *et al.*, 2012].

Las plantas acuáticas son conocidas por su potencial para bioacumular metales pesados [Rai *et al.*, 1995]. Responden al estrés por el aumento de un metal con la producción de antioxidantes y fitoquelatinas [Gupta *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1998; Rai *et al.*, 1995 y Tripathi *et al.*, 1996]. El potencial de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) para la bioacumulación de metales pesados garantiza su utilización en fitorremediación [Ali *et al.*, 2001 y Sinha, 1999]; por ejemplo es capaz de bioacumular As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni y Pb [Hussain *et al.*, 2010].

Pramod et al., (2011) determinó que la macrófita acuática *Eichhornia crassipes* L. es capaz de remover selenio de una solución acuosa contaminada con selenio. *Campos*, (2013) evaluó y determino que *Eichhornia crassipes* L. es capaz de acumular mayor cantidad de selenio (IV) en hojas que en raíces. *Hussain et al.*, (2011) determinó que *Bacopa monnieri* (Hisopo de agua) tuvo el potencial de acumular mercurio en mayor proporción en raíces y vástago que en hojas. *Mechora et al.*, (2014) realizó un muestreo de diferentes macrófitas en lechos acuosos contaminados con selenio, determinando que *Callitriche spp.*, *Lemna minor* L, *Myriophyllum spicatum*, *Veronica angallis-aquatica* acumularon selenio en sus tejidos. Teniendo en cuenta los trabajos de investigación realizados con especies vegetales acuáticas para “bioacumular” selenio, se utilizó a *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) para bioacumular selenio bajo condiciones de invernadero.

CAPITULO I

I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RECOLECCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

La especie vegetal *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) fue recolectada y aislada de las lagunas del Santuario de los Humedales de Mejía (Islay). Siendo la ubicación política y geográfica la siguiente:

1.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Latitud : 17° 08' 49" S

Longitud: 71° 51' 47" O

Altitud : 13 m.s.n.m.

1.2 UBICACIÓN POLÍTICA

Departamento: Arequipa

Provincia : Islay

Distrito : Mejía

La recolección de la especie vegetal fue realizada de manera aleatoria, de tal manera que se tomó muestras representativas de los alrededores de las lagunas de Mejía.

2. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL *Bacopa monnieri* L.

La especie vegetal fue identificada en el HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, donde el director del herbario hizo constar mediante la constancia N° 18-2015-HUSA (ANEXOS II) que la especie vegetal presentada corresponde a *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) .

3. ESPECIE VEGETAL *Bacopa monnieri* L. (HISOPO DE AGUA)

3.1 TAXONOMIA

Según el Herbarium Arequipense HUSA de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa (2015), la clasificación taxonómica de la especie vegetal se muestra en la **TABLA 3.1**.

TABLA 3.1. Taxonomía de la especie vegetal macrófita Hisopo de agua.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnolipsida
Subclase	Asteridae
Orden	Scrophulariales
Familia	Scrophulariaceae
Género	Bacopa
Especie	<i>Bacopa monnieri</i> L.

Fuente: Herbarium Arequipense HUSA, 2015.

3.2 ETAPA DE ADAPTACIÓN

Las condiciones de temperatura de la zona de origen de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) presentaron una temperatura promedio mensual mínima de 19°C y una máxima de 30°C; sin embargo durante su traslado a la ciudad de Arequipa existió un cambio en las condiciones ya que la temperatura promedio mínima fue de 9°C y la máxima de 23°C [SENAMIH, 2015]. Este rango de temperaturas de la ciudad de Arequipa no fue favorable para el desarrollo y crecimiento de la macrófita.

Curt, (2005) señala que algunas macrófitas muestran gran adaptabilidad ecológica a climas tropicales, desarrollándose bien en zonas húmedas, estanques, zonas húmedas, marismas, lagos, pantanos y ríos; el crecimiento de las macrófitas se incrementa cuando las temperaturas promedio

se encuentran en un rango de 20-30°C, así es recomendable para un buen desarrollo de las macrófitas 90% de humedad relativa y una temperatura en un rango de 22.5 a 35°C. *Acosta y Agüero, (2006)* también resaltan que las especies macrófitas sometidas a óptimas condiciones de temperatura llegan desarrollan su máxima biomasa en verano; la temperatura es un factor importante en cuanto al ciclo y distribución de las plantas en zonas templadas, durante el invierno el agua baja su temperatura por debajo del rango óptimo y las plantas mueren en el sedimento. Algunas plantas macrófitas no desarrollan su ciclo en aguas turbias y profundas donde la luz no alcanza para que la planta realice fotosíntesis; aunque, pueden crecer a una baja intensidad de luz, que puede ser hasta del 1% respecto al que ocurre sobre la superficie [*Barko et al., 1986*].

Teniendo en cuenta las condiciones ambientales (temperatura, humedad y otros) fue necesario diseñar y construir un invernadero tipo capilla con malla antiáfido (**FIGURA 3.1**) para mantener las condiciones de temperatura, humedad y luz lo más homogéneo posible con el fin de adaptar la macrófita bajo condiciones de invernadero en un periodo de 1 a 2 meses.

Según *Estrada, (2010)* un invernadero permite controlar el ambiente interno, modificando y creando las condiciones adecuadas para el desarrollo de una especie vegetal, de esta manera la temperatura, humedad y luz en el interior del invernadero se mantienen de manera homogénea. Para el diseño y construcción del invernadero se tuvo en consideración una serie de medidas (**ANEXOS II: Tabla 2.1**).



FIGURA 3.1. Invernadero tipo capilla.

3.3 ETAPA DE PROPAGACIÓN

Bacopa monnieri L. (Hisopo de agua) tiene la capacidad de propagarse asexualmente por estolones, lo cual nos hace obtener a partir de brote apical una nueva plántula de la cual emergen raíces adventicias.

Según *Farías, (2013)* hace mención que la propagación vegetativa por estolones constan de secciones relativamente largas y delgadas de tallos aéreos horizontales con entrenudos largos y cortos alternados que generan raíces adventicias; la separación de estos segmentos enraizados permite el desarrollo de plantas hijas. Considerando esta ventaja de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua), se planteó la utilización de tres tipos de soluciones nutritivas para su desarrollo y crecimiento teniendo en cuenta los requerimientos nutritivos de toda especie vegetal como son los nutrientes esenciales (macronutrientes y micronutrientes) como lo resaltan *Azcón y Talón (2001)* que indican que toda especie vegetal será incapaz de completar su ciclo vital en ausencia de un elemento mineral, la función de dicho elemento no podrá ser reemplazado por otro elemento mineral y ese elemento mineral debe estar implicado en el metabolismo de la especie vegetal.

Se utilizaron tres tipos de tratamientos para evaluar el sistema nutritivo más adecuado y eficiente para obtener el mayor número de brotes en el menor tiempo posible; como medio nutritivo se utilizó una solución nutritiva de Hoagland de la Universidad Nacional Agraria La Molina cuya composición química es nitrato de amonio, nitrato de potasio, superfosfato triple, sulfato de magnesio, quelato de hierro, sulfato de magnesio, ácido bórico, sulfato de zinc, sulfato de cobre y molibdato de amonio. Adicionalmente se utilizó una solución Súper Húmica que estuvo compuesta por ácidos húmicos y fúlvicos.

Los tratamientos fueron los siguientes: T1: solución Súper húmica (2 mL), T2: solución nutritiva de Hoagland (10 mL de solución “A” y 4 mL de solución “B”) y T3: solución Súper húmica (2 mL) + solución nutritiva de Hoagland (10 mL de solución “A” y 4 mL de solución “B”). Finalmente 16 plantas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) fueron colocadas con la finalidad de cuantificar el número de propagadas después de 45 días de trasplante (**TABLA 3.2; ANEXOS II: FIGURA 2.1**).

La **TABLA 3.2** muestra el número de plantas obtenidas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) bajo condiciones invernadero. Las evaluaciones fueron realizadas a los 1, 15, 30 y 45 días después de trasplante de la macrófita.

TABLA 3.2. Número de plantas al día 1, 15, 30 y 45 durante la etapa de propagación de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua).

T	1 d.d.t.	15 d.d.t.	30 d.d.t.	45 d.d.t.
	$\bar{X} \pm s$	$\bar{X} \pm s$	$\bar{X} \pm s$	$\bar{X} \pm s$
T3	6.557 ± 0.196 a	19.777 ± 1.503 a	31.110 ± 1.681 a	42.110 ± 2.041 a
T2	6.557 ± 0.196 a	16.113 ± 0.509 b	23.887 ± 0.510 b	31.890 ± 6.308 b
T1	6.780 ± 0.191 a	11.113 ± 0.509 c	16.113 ± 0.510 c	24.443 ± 2.036 b

n=3 (tres muestras por tratamiento), T: Tratamientos, T1: Solución Súper húmica, T2: Solución nutritiva de Hoagland, T3: Ácidos húmicos + solución nutritiva de Hoagland, d.d.t.: Días después de trasplante, \bar{X} : Promedio de plantas, s: Desviación estándar, (): Letras iguales no hay significancia.*

Según el análisis de varianza (**ANEXOS II: TABLA 2.2, 2.3, 2.4, y 2.5**) indica que no existe diferencia estadística significativa entre tratamientos 1 d.d.t., pero si a los 15, 30 y 45 d.d.t. Luego se procedió a realizar el test de Duncan un nivel de 0,05 de confianza; mostrando que 1 d.d.t. no existe diferencia estadística significativa entre tratamientos presentando valores entre 6.557 ± 0.196 y 6.780 ± 0.191 plantas; 15 y 30 d.d.t. existió diferencia estadística significativa entre tratamientos siendo el rango de valores máximos de 19.777 ± 1.503 y 31.110 ± 1.681 plantas para el tratamiento T3, mientras que los valores mínimos estuvieron entre 11.113 ± 0.509 y $16.113 \pm 0,510$ brotes para el tratamiento T1. Finalmente 45 d.d.t. no hubo diferencia estadística significativa entre los tratamientos T1 y T2, pero sí de ellos con T3, obteniéndose valores entre 24.443 ± 2.036 a 42.110 ± 2.041 plantas.

Existen estudios de investigación que determinaron el efecto de ácidos húmicos en combinación con la solución nutritiva de Hoagland sobre diversos cultivos (granadilla, tomate, trigo, etc.) donde se determinó efectos positivos en el aumento del crecimiento de planta, el estímulo de una mayor

producción de biomasa y el incremento de absorción de nutrientes [Schnitzer, 1981; Chen *et al.*, 1994; Adani *et al.*, 1998 y Veneros *et al.*, 2014]. Además se debe mencionar que los ácidos húmicos están implicados en diversos mecanismos como la respiración celular, fotosíntesis, síntesis de proteínas, activación de sistemas enzimáticos, absorción de agua y nutrientes [Vaughan y Malcolm, 1976; Vaughan y Ord, 1981; Piccolo *et al.*, 1992; Nardi *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Zhang y Ervin, 2004 y Canellas y Olivares, 2014].

Entonces los efectos de los ácidos húmicos sobre de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) son beneficiosos en la producción de la biomasa, crecimiento y proagación de plantas, siendo el tratamiento T3 (solución Súper húmica + solución nutritiva de Hoagland) el mejor tratamiento con respecto a los demás, mostrando un valor de 42.110 ± 2.041 plantas. Expresando en términos de porcentaje en el tratamiento T3 se observa un incremento del 32.048% con respecto al tratamiento T2 que es utilizado en la mayoría de los sistemas hidropónicos como fuente nutritiva para la producción de cultivos.

Durante la etapa de propagación también se consideró factores meteorológicos, entre ellos la temperatura y humedad relativa, que fueron registrados con la ayuda de un termohigrómetro durante los meses de Mayo y Junio (**ANEXOS II: TABLA 2.6**).

Knipling et al., (1970) propone que existe una relación entre la temperatura y el crecimiento de macrófitas, especialmente si la temperatura se encuentra en un rango entre 14 a 29°C y si está por debajo de 13°C hay un cese en el crecimiento y desarrollo de nuevas hojas; *Wilson et al.*, (2005) asume que la temperatura y el nivel de nutrientes (especialmente nitrógeno y fosforo) es importante sobre el crecimiento de las macrófitas.

Para nuestro experimento la temperatura promedio en el mes de Junio no fue favorable ya que se registró una temperatura mínima de 9.2°C y que al promediarla con la máxima resulto 17.5°C; y con respecto a la humedad relativa se mantuvo en el rango establecido (**ANEXOS II: TABLA 2.6**).

4. VALIDACIONES

Para realizar la determinación voltamperométrica de selenio (IV) fue necesario realizar una validación; según la ISO 17025: 2005 la validación tiene como objetivo es confirmar y documentar que los resultados obtenidos sean confiables para un propósito [INTI-Química, 2005].

Las validaciones fueron realizadas en la estación voltamperométrica 979 VA Computrace (ANEXOS II, FIGURA 2.2) teniendo en cuenta el manual de aplicación de Metrohm.

4.1 VALIDACIÓN ELECTRÓNICA

Según el manual de Metrohm para realizar esta validación es necesario determinar dos aspectos: el primero fue el Test de la linealidad y el segundo el Test del pico, estando el resultado en función de la intensidad de corriente (A) y el voltaje (V).

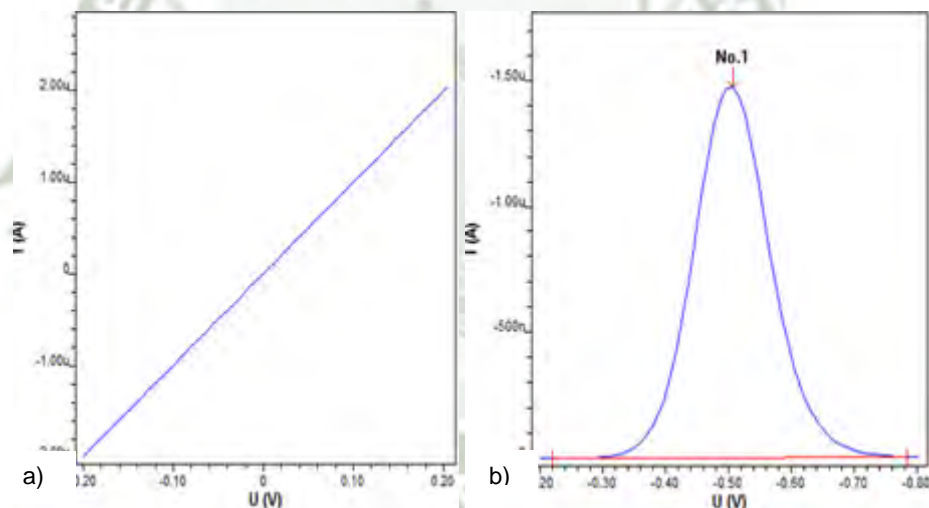


FIGURA 4.1. a) Gráfico lineal expresado en función de la intensidad de corriente (A) y la rampa de voltaje (V), b) Voltamperograma expresado en función de la intensidad de corriente (A) y la rampa de voltaje (V).

La **FIGURA 4.1** muestra un gráfico lineal y un voltamperograma expresado en función de la intensidad de corriente (A) y la rampa de voltaje (V). El gráfico de linealidad fue obtenido de la intensidad de corriente mínima de $-2 \mu\text{A}$ y una máxima de $2 \mu\text{A}$ frente a una rampa de voltaje mínima

de -200 mV y una máxima de 200 mV. La tolerancia de intensidad de corriente mínima es de $-1.6 \mu\text{A}$ a $-2.4 \mu\text{A}$ y la máxima de $1.6 \mu\text{A}$ a $2.4 \mu\text{A}$ según los parámetros establecidos por Metrohm; con estos resultados obtenidos se confirma la gráfica lineal para la validación electrónica, es decir la rampa de voltaje es óptima para la utilización del equipo. El voltamperograma obtenido, mostró voltaje máximo de -499 mV y una intensidad de corriente máxima de $-1.47 \mu\text{A}$. La tolerancia para el voltaje es de -450 mV a -550 mV y para la intensidad de corriente de $-2 \mu\text{A}$ a $4 \mu\text{A}$ según los parámetros establecidos por Metrohm. Dado que los valores especificados por Metrohm se cumplen, se afirma que el equipo se encuentre en buen estado para su uso.

4.2 VALIDACIÓN QUÍMICA

Según el manual de Metrohm, para realizar la validación química se procedió a colocar en la celda electroquímica del voltamperómetro 20 mL de agua ultrapura, 100 μL de solución estándar del ión Pb a $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y 0,5 mL de electrolito de cloruro de potasio (KCl) a 3 M.

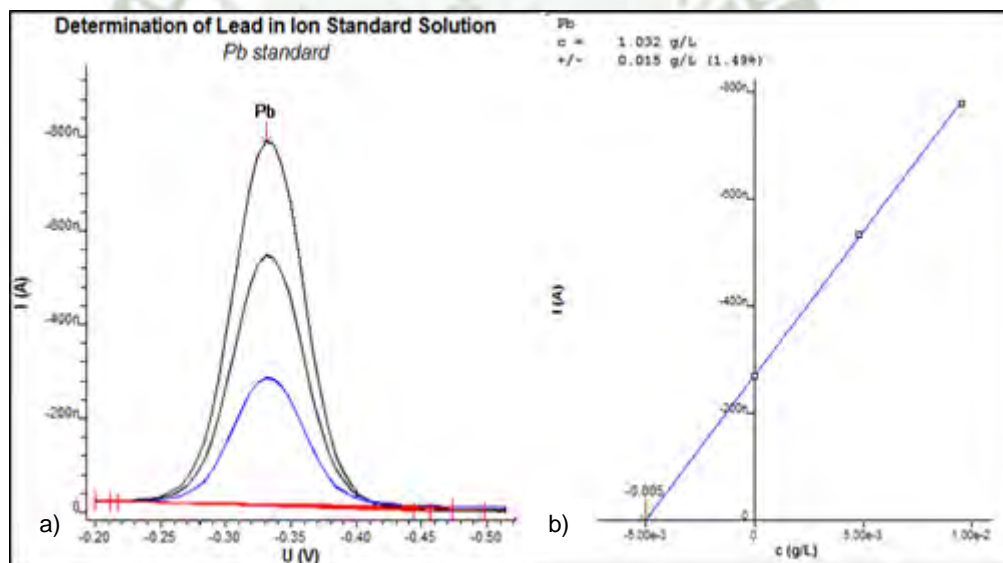


FIGURA 4.2. a) Voltamperograma expresado en función de la intensidad de corriente (A) y la rampa de voltaje (V); b) Gráfico lineal expresado en función de la intensidad de corriente (A) y la rampa de voltaje (V).

La **FIGURA 4.2** muestra un voltamperograma en función de la intensidad de corriente (A) y la rampa de voltaje (V), que contiene picos simétricos, los cuales fueron creciendo hasta alcanzar una

intensidad de corriente máxima de -800 nA frente a una rampa de voltaje mínima de -200 mV y una máxima de -500 mV ; además se observa una gráfica lineal en función de la concentración de analito (g.L^{-1}) y la intensidad de corriente (A), la cual llega a una intensidad de corriente máxima de -800 nA frente a un rango de concentraciones de 0.005 g.L^{-1} a 0.01 g.L^{-1} .

La concentración determinada por el equipo es 1.032 g.L^{-1} de plomo, y como se sabe la tolerancia debe estar en un rango de 0.95 a 1.05 g.L^{-1} según los parámetros establecidos por Metrohm. Dicha concentración final depende del cuidado y la preparación óptima de la solución y las adiciones estándar que se realizan; al estar dentro del rango establecido, se concluye con la validación química dado el cumplimiento de los parámetros establecidos por Metrohm.

4.3 VALIDACIÓN ANALÍTICA DEL MÉTODO

Según la ISO 17025: 2005, la validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado [INTI-Química, 2005].

4.3.1 LINEALIDAD

Según la ICH, 2005; la linealidad de un método analítico es la capacidad de producir resultados que sean directamente o por medio de una transformación matemática definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra [INTI-Química, 2005].

Los resultados obtenidos en la estación voltamperométrica muestran un voltamperograma con 7 picos simétricos donde el rango de intensidad de corriente está entre -23.742 ± 0.475 y $-170.754 \pm 1.434 \text{ nA}$, frente a una rampa de voltaje mínima de -540 mV y una máxima de -720 mV (ANEXOS II: FIGURA 2.3).

Con los datos de las intensidades registradas por el voltamperómetro (ANEXOS II: TABLA 2.8) se procedió a construir una curva de calibración para la linealidad que estuvo en función de la concentración de selenio (mg.L^{-1}) y la intensidad de corriente (nA) que se muestra en la FIGURA N° 4.3.

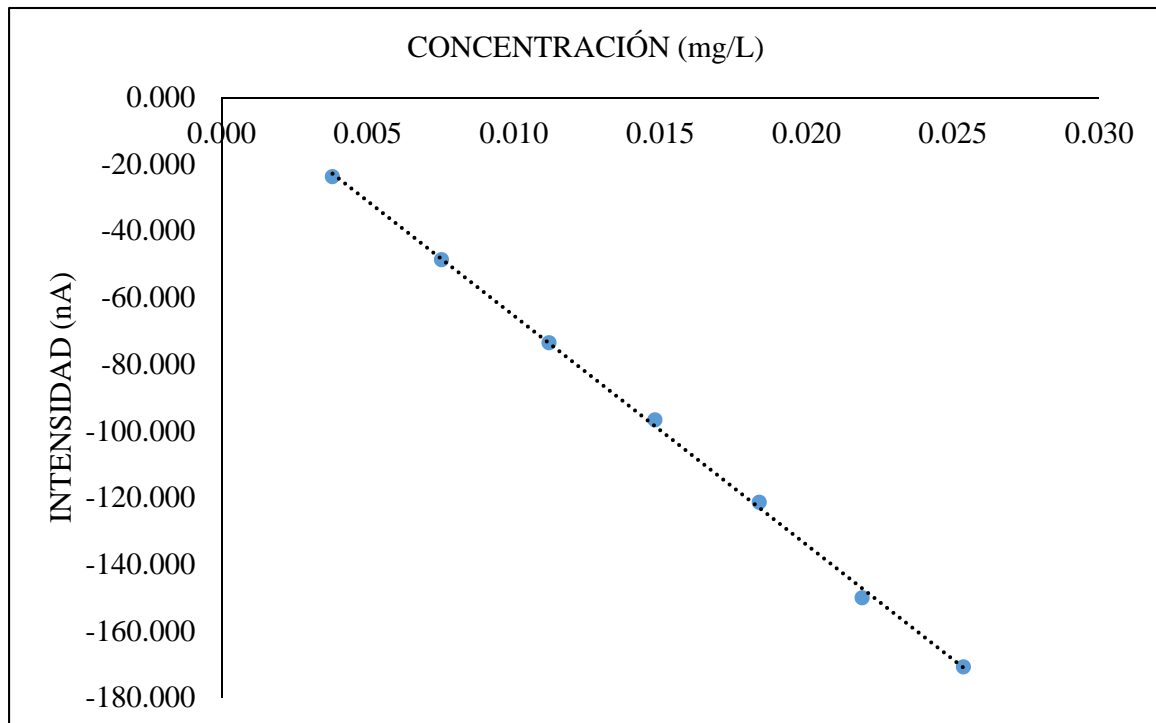


FIGURA 4.3. Representación gráfica de la linealidad del método para la determinación de selenio (IV).

Del análisis estadístico de regresión lineal (**ANEXOS II: TABLA 2.9**) obtenemos la ecuación $y = -6870.326x + 3.224$, donde el intercepto (a) y la pendiente (b) tienen valores de 3.222 y -6870.326 respectivamente. Además observamos que el coeficiente de correlación (r) tiene un valor de 0,999 que es muy cercano a la unidad, mostrando así un alto grado de correlación entre la variable “x” concentración (mg.L^{-1}) y la variable “y” intensidad (nA), sin embargo el coeficiente de correlación (r) no es el único parámetro para el análisis de linealidad, siendo el coeficiente de determinación (r^2) con un valor de 0,999 el cual indica mayor significación estadística ya que expresa la proporción de la variación total, envase al modelo. Por otro lado, el coeficiente de correlación ajustado (r^2 ajustado) con un valor de 0.999, es una mejora del coeficiente de correlación (r^2), de tal modo que el modelo de regresión elaborado, tiene una fuerte consistencia, en explicar las variables estudiadas.

Pero al comparar nuestro coeficiente de correlación con la AOAC que estipula que el coeficiente de correlación debe ser ≥ 0.995 , se asume que nuestros parámetros están dentro de lo establecido por la norma AOAC.

4.3.2 PRECISIÓN

Según la AOAC, 2002; la precisión se refiere al grado de concordancia de una serie de medidas tomadas a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones lo más constante posible.

A. Repetibilidad: Para obtener un valor más representativo de la precisión en términos de repetibilidad se deben realizar repeticiones simultáneas en diferentes momentos (pero el mismo día), en un mismo laboratorio y por un mismo operador [AOAC, 2002]. Esta operación se realizó en un intervalo de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y con el mismo equipo. La precisión se puede expresar en términos de desviación estándar (s) y desviación estándar relativa o coeficiente de variación (%).

Los resultados obtenidos por la estación voltamperométrica (**ANEXOS II: TABLA 2.10**) muestran el registro de las intensidades, su promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (%). Siendo el registro de intensidades de -24.232 ± 0.853 a -171.378 ± 0.674 nA donde el rango del coeficiente de variación (%) estuvo desde -0.393% a -3.519% . La AOAC estipula que para una concentración 0.5 mg.L^{-1} el coeficiente de variación (%) no debe superar el 5.5% , por lo tanto nuestro método resulta ser repetible por cumplir este requerimiento.

4.3.3 EXACTITUD

La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia [AOAC, 2002]. Una manera para determinar la exactitud es el % de recuperación.

Los resultados obtenidos por la estación voltamperométrica (**ANEXOS II: TABLA 2.11**) muestran la concentración determinada en raíces y hojas con valores de $0,4516 \pm 0.009$ y $0.4439 \pm 0.012 \text{ mg.L}^{-1}$, y al realizar la conversión a porcentaje de recuperación se obtuvo en raíces

88.780% y en hojas 88.417%; estos resultados fueron comparados con aquellos que establece la AOAC, que estipula que el porcentaje de recuperación para concentraciones entre 0.1 mg.L⁻¹ y 1 mg.L⁻¹ deben tener porcentaje de recuperación entre 80% y 110%, por lo que se encuentra dentro del rango establecido.

4.3.4 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Según la AOAC, el límite de detección (LD) es la mínima concentración o masa del analito que puede ser detectada en un método dado. Mientras que el límite de cuantificación (LC) es la mínima concentración o masa del analito de un método determinado que se puede cuantificar. Las ecuaciones para determinar ambos límites son las siguientes: $LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b \cdot \sqrt{n}}$ y $LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b \cdot \sqrt{n}}$.

Teniendo en consideración la pendiente ($b = -6870.326$), intersección ($Y_{bl} = 3.222$) y la desviación estándar del blanco ($S_{bl} = 0.957$) se calculó el límite de detección cuyo valor es $3.353 \cdot 10^{-1} \mu\text{g.L}^{-1}$ y el límite de cuantificación (LC) cuyo valor es $7.093 \cdot 10^{-1} \mu\text{g.L}^{-1}$ (ANEXOS II: TABLA 2.9 y 2.12). Con ello se deduce que el método es capaz de detectar mínimas cantidades de selenio (IV) en una muestra, considerando que la concentración este por encima de $3.353 \cdot 10^{-1} \mu\text{g.L}^{-1}$; además el método es confiable ya que cuantifica cantidades mayores o iguales a $7.093 \cdot 10^{-1} \mu\text{g.L}^{-1}$.

5. BIOENSAYO DE TOXICIDAD

El interés en selenio (Se) ha sumado importancia en las últimas décadas; en pequeñas cantidades se comporta como un micronutriente esencial y tiene beneficios en la nutrición para animales y plantas, sin embargo a concentraciones altas puede ser tóxico para animales y para seres humanos [CG, 1980; Nyberg, 1991 y Lemly, 1997].

En especies vegetales el selenio (Se) puede ejercer efectos beneficiosos a bajas concentraciones ya que garantiza un crecimiento, producción de biomasa y juego importante en los procesos antioxidativos; sin embargo cuando las plantas están expuestas a altas concentraciones de selenio (Se) en su medio de raíz, se pueden presentar síntomas externos en la planta como clorosis (amarillamiento), inhibición del crecimiento, marchitamiento, disminución de la síntesis de proteínas y la muerte prematura de la planta

[Trelease, 1949 y Mengel *et al.*, 1987]. Diversos estudios han demostrado que el selenio en niveles altos sobre la planta tiene efectos negativos sobre diversas funciones de las plantas.

Molnárová et al., (2009) evaluó los efectos del selenio (IV) en *Sinapsis alba* L. y *Brassica napus* L. durante 7 días de exposición, determinando que la primera especie es más sensible que la segunda, además detalla que a concentraciones de 14 a 26 mg.L⁻¹ inhiben la clorofila (a y b) e incrementan los carotenoides como consecuencia del estrés que sufre la planta. *Pramod et al.*, (2011) analizó los efectos que provocaron diferentes concentraciones de selenio (IV) sobre *Eichhornia crassipes* L., determinando que concentraciones por encima de 20 mg.L⁻¹ generan la inhibición de la clorofila (a, b y total), niveles de proteínas, carbohidratos, almidón y aminoácidos. *Campos*, (2013) determinó el efecto de selenio (IV) en *Eichhornia crassipes* L., donde demostró que 10 días después a una concentración de 50 mg.L⁻¹, el selenio inhibe el crecimiento de la planta y genera síntomas de senescencia, abscisión y necrosis en hojas.

Un instrumento alternativo y que complementa los tradicionales análisis químicos para la determinación de toxicidad de muestras ambientales es la utilización de un bioensayo de toxicidad, ya que los organismos vivos presentan alguna respuesta a niveles altos de cualquier sustancia xenobiótica [CETESB, 1991].

Los bioensayos *in vitro* han tomado una aceptación en las estrategias de biomonitoreo, fundamentalmente porque suministran resultados confiables, simples, rápidos y costos efectivos [Gustavson *et al.*, 2000]. En las últimas décadas se han desarrollado bioensayos rápidos con el uso de especies vegetales como organismos de prueba que funcionan como una buena herramienta de trabajo para el monitoreo ambiental.

Se planteó 4 tratamientos a concentraciones de 0, 5, 10 y 20 mg.L⁻¹ de selenito de sodio pentahidratado (Na₂SeO₃.5H₂O). Finalmente 3 plántulas de 5-7 cm de altura que tenían 30 días de crecimiento desde la etapa de propagación fueron considerados para la experimentación. En este bioensayo se obtuvo como resultados una escala evolutiva de toxicidad descrita en un envase a una escala de grado de toxicidad que se encuentra descrito en la **TABLA 5.1**.

TABLA 5.1. Evolución de la toxicidad a diferentes concentraciones de selenito de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) durante 16 días de experimentación.

TIEMPO (DÍAS)	T0 ^(a)		T1 ^(b)		T2 ^(c)		T3 ^(d)	
	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja
0	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1	G1
1	G1	G1	G2	G2	G2	G2	G3	G3
4	G1	G1	G3	G3	G3	G3	G5	G5
7	G1	G1	G3	G3	G4	G4	G7	G7
10	G1	G1	G3	G4	G4	G5		
13	G1	G1	G3	G4	G5	G6		
16	G1	G1	G4	G5	G6	G6		

(a): testigo, (b): 5 mg.L^{-1} , (c): 10 mg.L^{-1} , (d): 20 mg.L^{-1} .

* Grado 1 (G1)

Raíz: No se observaron síntomas.

Hojas: No se observaron síntomas.

* Grado 2 (G2)

Raíz: Ligeras manchas necróticas.

Hojas: En tercio inferior con áreas cloróticas sobre la lámina de las hojas. En el tercio medio y superior no se observaron síntomas.

* Grado 3 (G3)

Raíz: Necrosis en avance.

Hojas: Tercio inferior con clorosis generalizada y/o arrugamiento de hojas. El tercio medio y superior con áreas cloróticas sobre la lámina de las hojas, con la diferencia que el tercio superior se empezó a manifestar deformación de las hojas en el ápice.

* Grado 4 (G4)

Raíz: Necrosis y senescencia de raíces.

Hojas: Tercio inferior con necrosis y/o arrugamiento de hojas. El tercio medio y superior con clorosis generalizada, arrugamiento y deformación de hojas en el ápice.

* Grado 5 (G5)

Raíz: Necrosis, senescencia y raíces quebradizas.

Hojas: Tercio inferior con inicios de senescencia, acortamiento y deformación de hojas. Y el tercio medio y superior con necrosis e inicios de senescencia.

* Grado 6 (G6)

Raíz: Senescencia en su totalidad y raíces quebradizas.

Hojas: Tercio inferior con senescencia en su totalidad y abscisión de hojas. El tercio medio con senescencia y formación de nuevos brotes axilares con necrosis. Y el tercio superior con senescencia en su totalidad y abscisión de hojas.

* Grado 7 (G7)

Raíz: Senescencia en su totalidad y raíces quebradizas.

Hojas: Tercio inferior con inferior con senescencia en su totalidad y abscisión de hojas. El tercio medio con senescencia y formación de nuevos brotes axilares con necrosis. Y el tercio superior con senescencia en su totalidad y abscisión de hojas, además de formación de nuevos brotes apicales con necrosis.

Durante el bioensayo de toxicidad se presentaron síntomas externos en los diferentes tratamientos en estudio (**FIGURA 5.1**) durante un periodo de 16 días. Según la descripción del grado de toxicidad (**TABLA 5.1**), al comparar tratamientos, observamos claramente que el tratamiento T0 no presenta síntomas de toxicidad en hojas y raíces durante un periodo de 16 días ya que se encuentra en grado 1 (G1) ambas partes de la planta, debido a que el tratamiento no contiene el contaminante selenito de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Los demás tratamientos empezaron a manifestar cambios externos a partir del día 1; en T1 y T2 se inició con ligeras manchas necróticas a nivel de la raíz y áreas cloróticas en hojas del tercio inferior. Luego del día 4 al 10 continúa el avance de la necrosis e inicio de senescencia en raíces y la clorosis

empieza a generalizarse con arrugamiento de hojas desde el tercio inferior al superior; y finalmente del día 10 al 16, las raíces lucen necrosadas, quebradizas y con inicios de senescencia; mientras que la aparición de necrosis, senescencia, acortamiento y deformación de hojas se inicia desde el tercio inferior; los nuevos brotes axilares generados en el tercio medio lucen necrosados; y la senescencia generalizada y abscisión de hojas es inminente en el tercio superior. Por otro lado el tratamiento T3 a partir del día 1, ya se empezó a necrosar las raíces y los síntomas de clorosis se generalizan a nivel de las hojas del tercio inferior, medio y superior; del día 5 al 7, las raíces lucen con senescencia en su totalidad y quebradizas, mientras que las hojas del tercio inferior, medio y superior empiezan a manifestar senescencia en su totalidad, abscisión de hojas y formación de nuevos brotes axilares y apicales necrosados.

De acuerdo a nuestros estudios observados, *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) a una concentración por encima de 10 mg.L^{-1} ya empieza a manifestar síntomas en hojas y raíces como clorosis, necrosis, abscisión y senescencia de hojas. Otros aspectos también fueron denotados como la inhibición del crecimiento de raíces, reducción de biomasa aérea, inhibición de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b y clorofila total) y poco ciclo vital de la especie macrófita después de 16 días.

Diversos estudios han demostrado que el selenio en niveles altos genera toxicidad en especies vegetales. *Mengel et al.*, (1987) afirma que la exposición de plantas a altas concentraciones de selenio en su medio de raíz, pueden presentar síntomas externos en la planta como clorosis (amarillamiento), inhibición del crecimiento, marchitamiento, disminución de la síntesis de proteínas y la muerte prematura de la planta. *Zayed et al.* (1998) afirma que algunos de los síntomas notorios en especies vegetales y cultivos se debe a la toxicidad que ejercen los metales pesados y selenio cuya consecuencia es la inhibición del crecimiento en hojas y raíces, además de presentar síntomas de clorosis y necrosis. *Peng et al.*, (2000) determinó que suelos por encima de 16 mg.L^{-1} se reduce considerablemente la germinación y crecimiento en plantas de *Triticum aestivum* L. *Pramod et al.*, (2011) analizó los efectos que provocaron diferentes concentraciones de selenio (IV) sobre *Eichhornia crassipes* L., determinando concentraciones por encima de 20 mg.L^{-1} generan la inhibición de la clorofila (a, b y total), niveles de proteínas, carbohidratos, almidón y aminoácidos.

Al comparar las investigaciones mencionadas con nuestro experimento, se cumple que concentraciones mayores a 10 mg.L^{-1} generan síntomas como clorosis, necrosis, abscisión, senescencia, debilidad e inhibición del crecimiento y desarrollo de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) por efectos de toxicidad que generó el selenio (IV) sobre la parte radicular y foliar por causa de un proceso de oxidación; entonces se establece que el nivel de tolerancia de la macrófita en estudio es hasta 10 mg.L^{-1} ya que el ciclo vital de la planta fue mayor con respecto a la concentración de 20 mg.L^{-1} que manifestó sintomatología de toxicidad cuyo ciclo vital fue de 10 días.

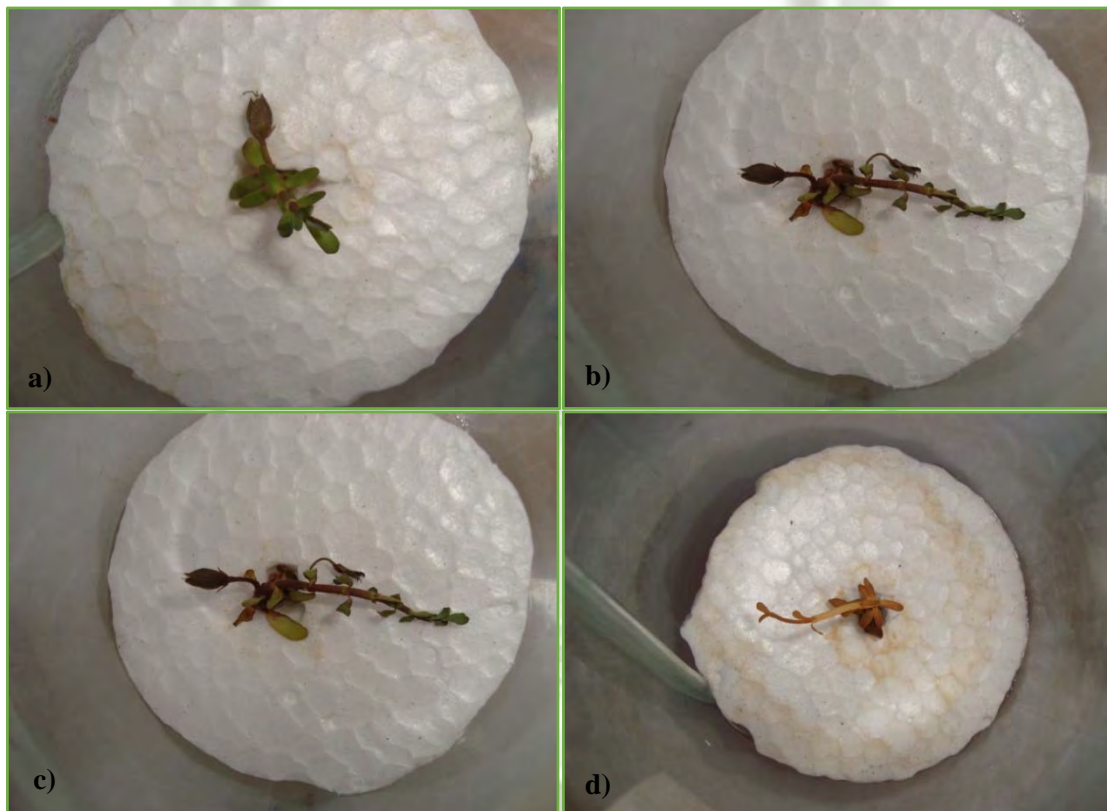


FIGURA 5.1. Bioensayo de toxicidad de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) a los 16 días de experimentación. a) T0: tratamiento blanco, b) T1: tratamiento a 5 mg.L^{-1} , c) T2: tratamiento a 10 mg.L^{-1} , d) T3: tratamiento a 20 mg.L^{-1} .

6. BIOACUMULACIÓN DE SELENIO

6.1 EXPERIMENTO PRELIMINAR

6.1.1 DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA

Antes de realizar el análisis de muestras por voltamperometría, fue necesario realizar una configuración en la estación voltamperométrica 979 (ANEXOS II: TABLA 2.7). Los resultados obtenidos del experimento preliminar se describen en la TABLA 6.1.

TABLA 6.1. Bioacumulación de selenio (IV) en raíces y hojas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) a diferentes concentraciones de selenito pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) durante 16 días de experimentación.

PARTE DE PLANTA	CONCENTRACIONES ^(a)	CONCENTRACIÓN DE SELENIO IV ^(b)
RAÍZ	5	249.762 ± 2.231
	10	315.270 ± 1.537
	20	429.297 ± 1.565
HOJA	5	105.701 ± 1.806
	10	218.266 ± 1.594
	20	302.044 ± 1.198

n=3 (tres muestras por tratamiento), (a): mg.L^{-1} , (b): $\text{mg.Kg}^{-1} + s$, *s*: Desviación estándar.

Después del análisis de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) se observa en la TABLA 6.1 que a una concentración de 20 mg.L^{-1} de pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) existió una mayor absorción, sin embargo el tiempo de tolerancia al contaminante fue de 10 días ya que su ciclo vital se paralizó debido a los síntomas en hojas y raíces que se observaron como consecuencia de la toxicidad de selenio y esto se detalla en el bioensayo de toxicidad (TABLA 5.1), siendo la acumulación en raíces de $429.297 \pm 1.565 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y en hojas de $302.044 \pm 1.198 \text{ mg.Kg}^{-1}$. Con respecto a las demás concentraciones, *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) mostró tolerancia al

contaminante mayor a 10 días, siendo la acumulación para una concentración de 5 mg.L^{-1} en raíces de $249.762 \pm 2.231 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y en hojas de $105.701 \pm 1.806 \text{ mg.Kg}^{-1}$; y para 10 mg.L^{-1} en raíces de $315.270 \pm 1.537 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y en hojas de $218.266 \pm 1.594 \text{ mg.Kg}^{-1}$. Los resultados preliminares denotan la capacidad de absorción de selenio (IV) en hojas y raíces de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) que ser comparadas con otras investigaciones, demuestran que son eficientes para bioacumulación de selenio.

Por ejemplo, Ornes *et al.*, (1991) evaluó 4 plantas acuáticas flotantes expuestas a selenio por un período de 15 días, encontrándose que *Eichhornia crassipes* acumuló $300 \mu\text{g.g}^{-1}$ de planta a partir de una solución de $2.5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Pramod *et al.*, (2011) determinó la bioabsorción de selenio en *Eichhornia crassipes* por un periodo de 8 días de tratamiento, obteniendo como resultado que para una concentración inicial de selenio de 10 mg.L^{-1} hubo un porcentaje de absorción del 100% y para 20 mg.L^{-1} del 93.05%. Mechora *et al.*, (2014) monitoreo selenio en macrófitas en lechos acuosos contaminados con selenio, encontrando que la especie macrófita *Veronica anagallis-aquatica* acumuló 1507 ng de selenio por g durante un periodo de 1 año.

Haciendo un breve análisis, la capacidad de absorción de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) en raíces resulta ser mayor que en hojas, además que los valores obtenidos son aceptables comparados con las investigaciones que fueron citadas, ya que la especie vegetal en estudio es macrófita y demostró tener la capacidad de bioacumular selenio al igual que *Veronica anagallis-aquatica* y *Eichhornia crassipes*.

6.2 EXPERIMENTO FINAL

El experimento final fue llevado a cabo en 9 recipientes de vidrio (30 x 30 x 40 cm), donde se preparó 10 L de volumen al cual se añadió una solución nutritiva de Hoagland (50 mL de solución “A” y 20 mL de solución “B”), selenito pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a diferentes concentraciones y se completó el volumen con agua potable. Entonces fueron 3 tratamientos a concentraciones de 0, 5 y 10 mg.L^{-1} de selenito pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Finalmente 10 plántulas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) de 5-7 cm de altura que tenían 30 días de crecimiento desde la etapa

de propagación fueron colocadas sobre una bandeja de poliestireno para el sostén y flotamiento de las plántulas (**FIGURA 6.1**).

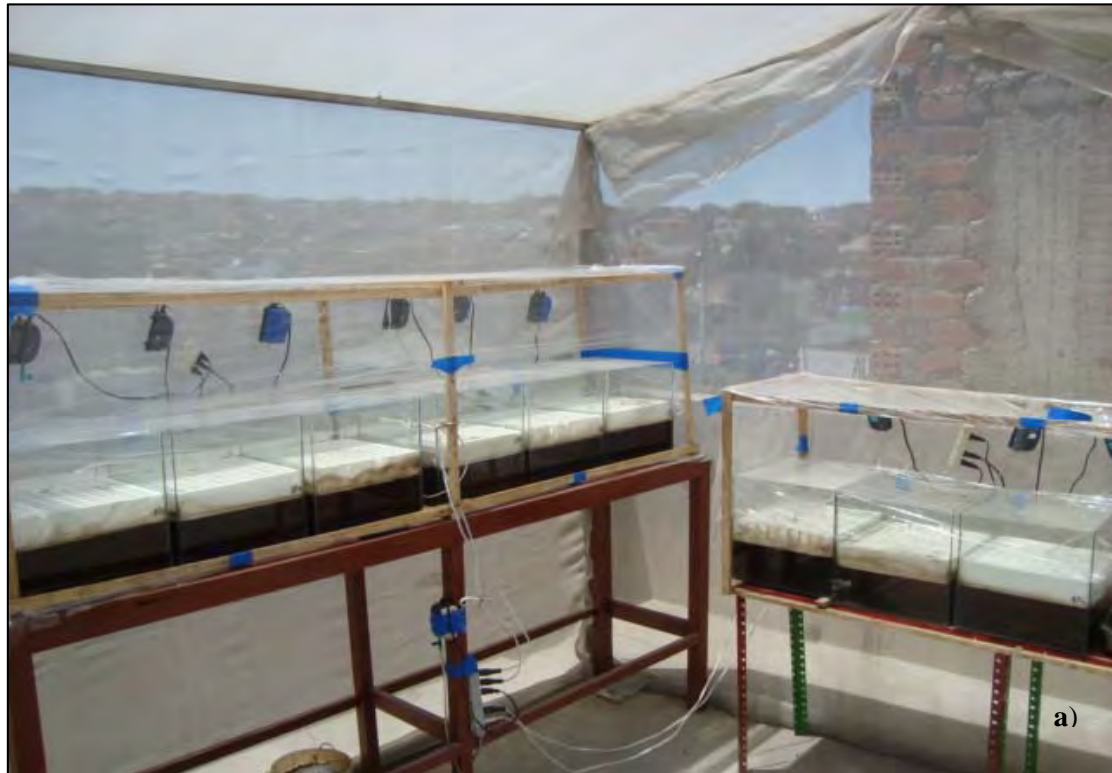


FIGURA 6.1. a) Instalación de experimento final para la bioacumulación de selenio (IV) utilizando *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) bajo condiciones de invernadero

6.2.1 TRATAMIENTO T0

El tratamiento testigo (T0) es denominado grupo control, es decir solamente contuvo la solución nutritiva de Hoagland. Se reportó una concentración inicial de 0.000 mg.Kg^{-1} durante los 25 días de experimentación, es decir que no hubo presencia de selenio en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua).

6.2.2 TRATAMIENTO T1 Y T2

Los tratamientos T1 y T2 son considerados los tratamientos experimentales de importancia ya que contienen el contaminante denominado selenito pentahidratado

($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a dos concentraciones que son a 5 mg.L^{-1} y 10 mg.L^{-1} . Los valores de acumulación de selenio (IV) en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) se muestran en el **TABLA 6.2.**

TABLA 6.2. Bioacumulación de selenio (IV) en raíces y hojas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) a 5 y 10 mg.L^{-1} de selenito pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) durante 26 días de experimentación.

T ^(a)	T1 ^(b)		T2 ^(c)	
	RAICES ^(d)	HOJAS ^(e)	RAICES ^(f)	HOJAS ^(g)
0	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
1	5.714 ± 0.162	0.000 ± 0.000	19.113 ± 0.393	0.000 ± 0.000
4	12.235 ± 0.296	15.671 ± 0.360	87.636 ± 1.242	34.957 ± 1.194
7	28.192 ± 0.751	18.212 ± 0.707	126.312 ± 1.469	40.449 ± 0.990
10	48.490 ± 0.970	44.411 ± 1.461	159.420 ± 1709	44.177 ± 0.652
13	71.359 ± 1.677	45.715 ± 0.715	181.805 ± 1.969	132.709 ± 1.540
16	98.106 ± 1.635	68.202 ± 1.677	195.961 ± 1.977	161.188 ± 1.695
19	115.963 ± 1.368	105.051 ± 0.636	210.206 ± 1.372	200.952 ± 1.457
22	135.112 ± 1.711	113.167 ± 1.676	220.509 ± 1.717	108.187 ± 0.538
25	174.689 ± 1.665	108.226 ± 2.206	282.935 ± 1.695	90.067 ± 0.640

$n=3$ (tres muestras por tratamiento), (a): tiempo expresado en días, (b)= 5 mg.L^{-1} , (c)= 10 mg.L^{-1} , (d)= $\text{mg.Kg}^{-1} \pm s$, (e)= $\text{mg.Kg}^{-1} \pm s$, (f)= $\text{mg.Kg}^{-1} \pm s$, (g)= $\text{mg.Kg}^{-1} \pm s$, s: Desviación estándar.

En el tratamiento T1 en raíces (**TABLA 6.2.** y **FIGURA 6.2**) se observa que existe una etapa de adaptación hasta el día 4, en donde la cantidad acumulada es leve debido a que hasta ese momento se acumuló $12.235 \pm 0.296 \text{ mg.Kg}^{-1}$, después existe un leve incremento de acumulación que se mantuvo hasta el día 16 con una cantidad acumulada de $98.106 \pm 1.635 \text{ mg.Kg}^{-1}$, finalmente se dio la etapa de mayor absorción en la raíz del día 16 al 25 hasta alcanzar

una cantidad acumulada de $174.689 \pm 1.665 \text{ mg.Kg}^{-1}$. Por otro lado la acumulación de selenio en hojas se dio a partir del día 4 y se mantuvo constante hasta el día 7, para luego surgir un leve incremento y mantenerse constante hasta el día 13 en donde alcanzó una cantidad acumulada de $45.715 \pm 0.715 \text{ mg.Kg}^{-1}$, a partir de ese instante se inicia la etapa de acumulación masiva hasta el día 22 cuya cantidad acumulada fue de $108.226 \pm 2.206 \text{ mg.Kg}^{-1}$, luego de ello surge la reducción de la cantidad acumulada a $108.226 \pm 2.206 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y esto se debe probablemente *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) se encuentre volatilizando el selenio de forma orgánica.

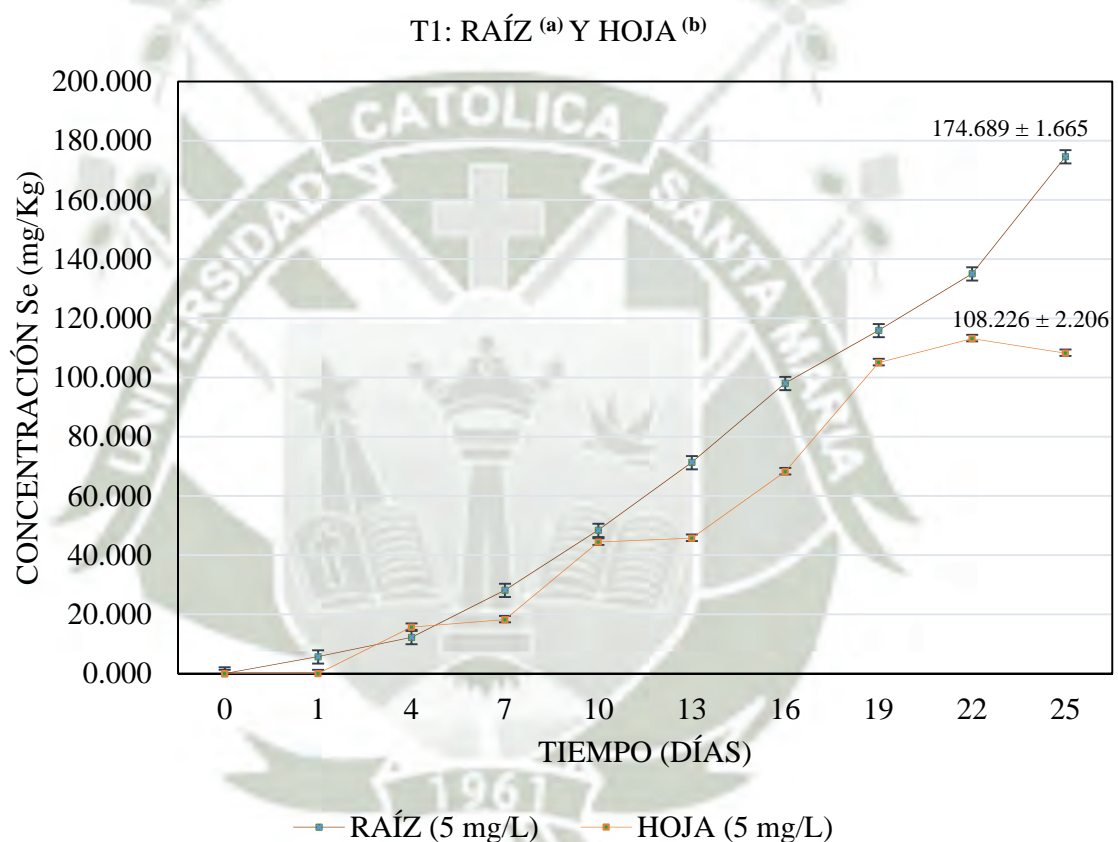


FIGURA 6.2. Curva de bioacumulación de selenio (IV) utilizando los promedios de raíces y hojas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) durante 25 días de experimentación. (a) 5 mg.L^{-1} . (b) 5 mg.L^{-1} .

En el tratamiento T1, se realizó una comparación para verificar si existió diferencia estadística significativa entre las concentraciones acumuladas de raíces y hojas *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) a 5 mg.L^{-1} de selenito pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Los resultados se observan en la **TABLA 6.3.**

TABLA 6.3. Análisis estadístico para el tratamiento T1 (raíces y hojas).

T ^(a)	PRUEBA F			PRUEBA t	
	F Calculado	F crítico $\alpha=0.05$	Varianza	t calculado	t crítico $\alpha=0.05$
1	-	-	-	-	-
4	15.050	19.000 n.s.	Homogénea	5.064	2.776 *
7	2.232	19.000 n.s.	Homogénea	19.125	2.776 *
10	0.860	19.000 n.s.	Homogénea	4.952	2.776 *
13	6.654	19.000 n.s.	Homogénea	24.696	2.776 *
16	1.571	19.000 n.s.	Homogénea	24.759	2.776 *
19	0.173	19.000 n.s.	Homogénea	5.305	2.776 *
22	1.564	19.000 n.s.	Homogénea	17.348	2.776 *
25	0.936	19.000 n.s.	Homogénea	48.081	2.776 *

n=3 (tres muestras), (a): tiempo expresado en días, (): Existe diferencia estadística significativa, (n.s.): No existe diferencia estadística significativa.*

La **TABLA 6.3** muestra que al realizar la prueba F, del día 4 al 25 no existió diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ debido a que el $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, por lo tanto se acepta la hipótesis nula y con ello se afirma que las varianzas son homogéneas. Luego se realizó la prueba de t, la cual indica que existió diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ debido a que el $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ y esto coincide con la **TABLA 6.2**, donde se observa que la cantidad acumulada de selenio IV del tratamiento T1 en Raíces>Hojas.

En el tratamiento T2 (**TABLA 6.2.** y **FIGURA 6.3**) el comportamiento de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) es diferente ya que existió una etapa de adaptación de 1 día, donde la cantidad acumulada es leve debido a que hasta ese momento se acumuló $19.113 \pm 0.393 \text{ mg.Kg}^{-1}$, después existió un incremento constante de acumulación hasta el día 22 con una cantidad acumulada de $220.509 \pm 1.717 \text{ mg.Kg}^{-1}$, después de ello surge la acumulación masiva hasta el día 25 cuya cantidad acumulada fue de $282.935 \pm 1.695 \text{ mg.Kg}^{-1}$. Mientras que la acumulación de selenio en hojas se dio a partir del día 4 en donde se mantuvo constante hasta el día 10 cuya concentración acumulada fue de $44.177 \pm 0.652 \text{ mg.Kg}^{-1}$, para luego surgir un incremento de acumulación

masiva hasta el día 13 cuya cantidad acumulada fue de $132.709 \pm 1.540 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y mantenerse constante hasta el día 19 en donde alcanzó una cantidad acumulada de $200.952 \pm 1.457 \text{ mg.Kg}^{-1}$, a partir de ese instante se inicia un decrecimiento de la acumulación de selenio hasta el día 25 en donde la acumulación fue de $90.067 \pm 0.640 \text{ mg.Kg}^{-1}$, probablemente este suceso se deba a la toxicidad y volatilización del selenio.

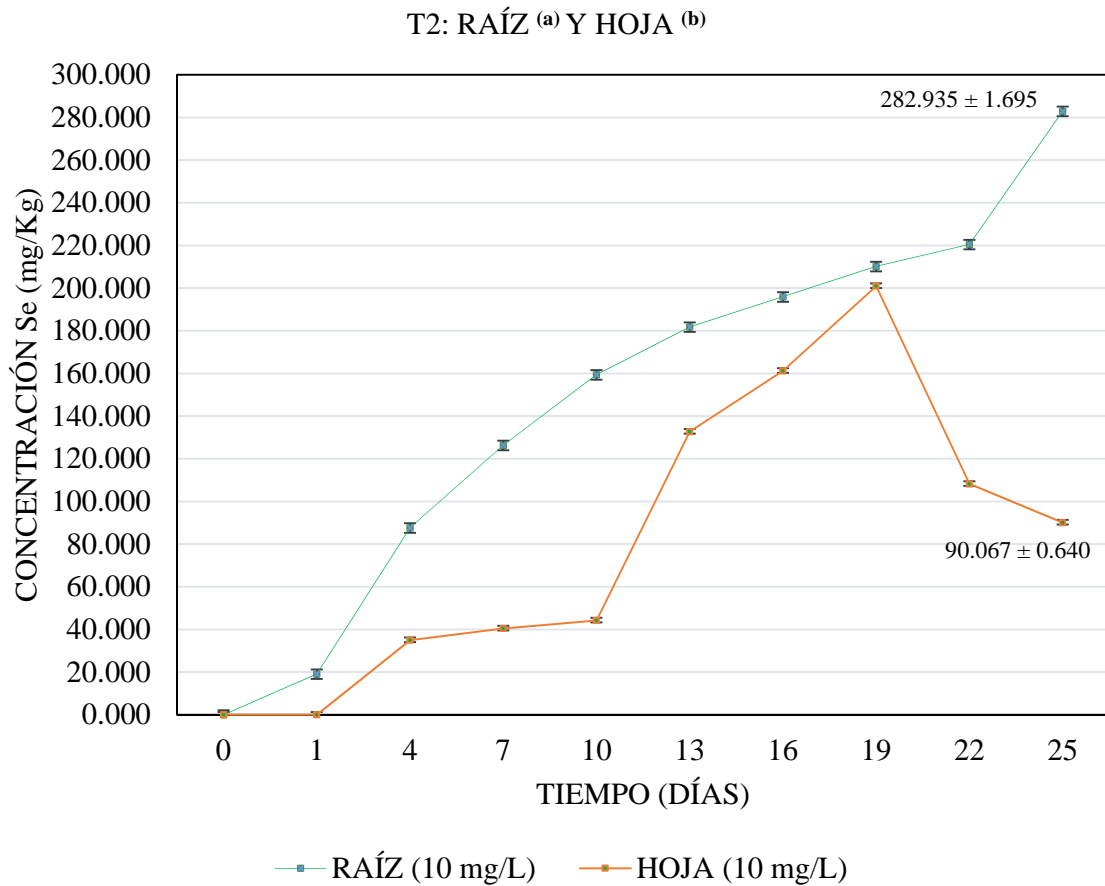


FIGURA 6.3. Curva de bioacumulación de selenio (IV) utilizando los promedios de raíces y hojas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) durante 25 días de experimentación. (a) 10 mg.L^{-1} . (b) 10 mg.L^{-1} .

En el tratamiento T2, se realizó una comparación para verificar si existió diferencia estadística significativa entre las concentraciones acumuladas de raíces y hojas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) a 10 mg.L^{-1} de selenito pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Los resultados se observan en la **TABLA 6.4**.

TABLA 6.4. Análisis estadístico para el tratamiento T2 (raíces y hojas).

T ^(a)	PRUEBA F			PRUEBA t	
	F Calculado	F crítico $\alpha=0.05$	Varianza	t calculado	t crítico $\alpha=0.05$
1	-	-	-	-	-
4	2.037	19.000	n.s. Homogénea	60.147	2.776 *
7	3.714	19.000	n.s. Homogénea	89.848	2.776 *
10	8.848	19.000	n.s. Homogénea	110.710	2.776 *
13	1.345	19.000	n.s. Homogénea	32.704	2.776 *
16	2.673	19.000	n.s. Homogénea	25.993	2.776 *
19	1.693	19.000	n.s. Homogénea	9.266	2.776 *
22	20.376	19.000	* Heterogénea	110.637	2.776 *
25	13.993	19.000	n.s. Homogénea	190.373	2.776 *

n=3 (tres muestras), (a): tiempo expresado en días, (): Existe diferencia estadística significativa, (n.s.): No existe diferencia estadística significativa.*

La **TABLA 6.4.** muestra que al realizar la prueba F, del día 4 al 25 no existió diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ debido a que el $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, por lo tanto se acepta la hipótesis nula y con ello se afirma que las varianzas son homogéneas; sin embargo el día 22 si existió diferencia significativa debido a que el $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, y con ello se afirma que las varianzas son heterogéneas. Luego se realizó la prueba de t, la cual indica que existió diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ debido a que el $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ y esto coincide con la **TABLA 6.2**, donde se observa claramente que la cantidad acumulada de selenio IV del tratamiento T2 en Raíces>Hojas.

La biacumulación de selenio (IV) en los tratamiento T1 y T2 (**TABLA 6.2.** y **FIGURA 6.4**) en raíces de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) denota que cuando las concentraciones suministradas son mayores, la raíz tiende a acumular mayor cantidad de selenio, siendo los síntomas de toxicidad son más notorios. El tratamiento T1 primero se adapta, la cantidad acumulada es leve ya que se acumuló $12.235 \pm 0.296 \text{ mg.Kg}^{-1}$, después existe un incremento

constante de acumulación que se mantuvo hasta el día 16 con una cantidad acumulada de $98.106 \pm 1.635 \text{ mg.Kg}^{-1}$, finalmente se dio la etapa de mayor absorción en la raíz del día 16 al 25 hasta alcanzar una cantidad acumulada de $174.689 \pm 1.665 \text{ mg.Kg}^{-1}$. Con respecto al tratamiento T2, en solo 1 día se adapta, donde la cantidad acumulada es leve debido a que hasta ese momento se acumuló $19.113 \pm 0.393 \text{ mg.Kg}^{-1}$, después surge un incremento constante de acumulación hasta el día 22 con una cantidad acumulada de $220.509 \pm 1.717 \text{ mg.Kg}^{-1}$, y al final surge la acumulación masiva hasta el día 25 cuya cantidad acumulada fue de $282.935 \pm 1.695 \text{ mg.Kg}^{-1}$.

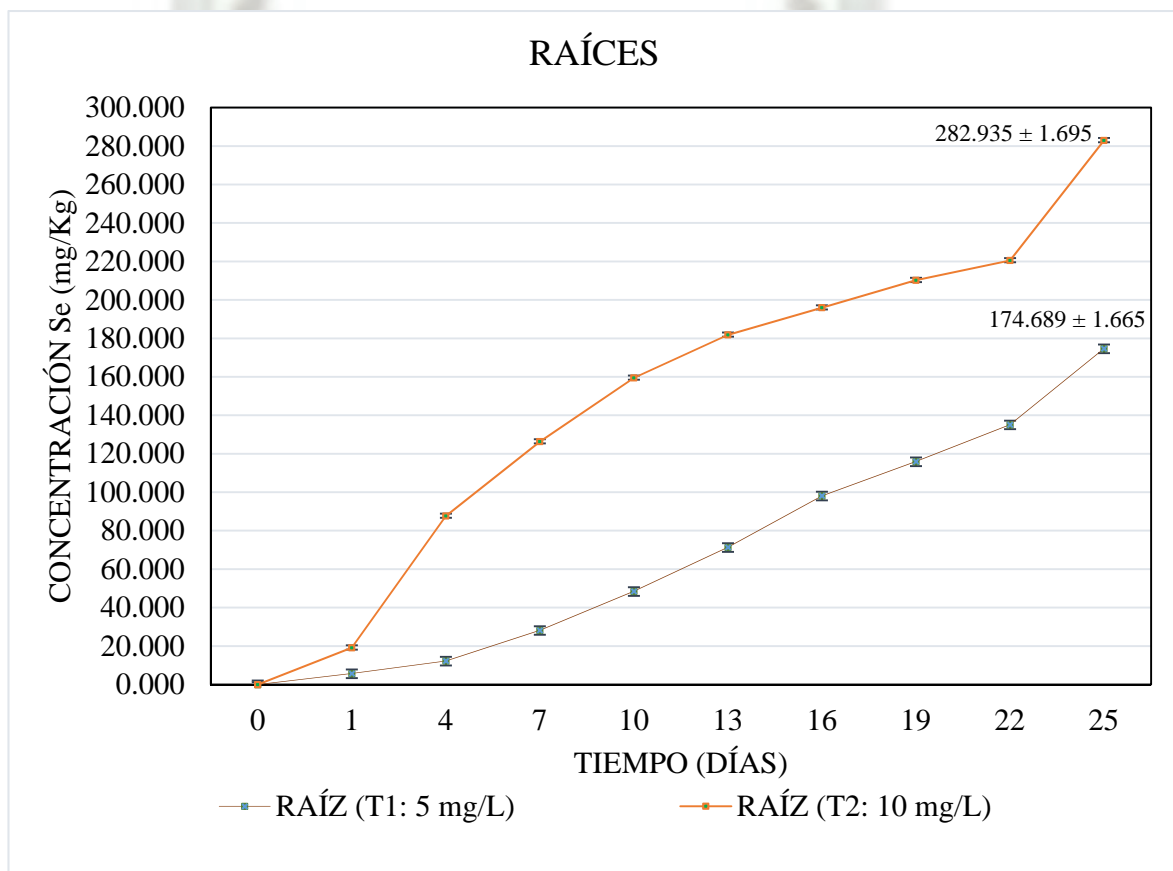


FIGURA 6.4. Curva de bioacumulación de selenio (IV) utilizando los promedios de raíces de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) durante 25 días de experimentación. (a) 5 mg.L^{-1} . (b) 10 mg.L^{-1} .

En los tratamientos T1 y T2, se realizó una comparación para verificar si existió diferencia estadística significativa entre las concentraciones acumuladas de raíces de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) a concentraciones de 5 y 10 mg.L^{-1} de selenito pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Los resultados se observan en la **TABLA 6.5**.

TABLA 6.5. Análisis estadístico para los tratamientos T1 y T2 (raíces).

T ^(a)	PRUEBA F			PRUEBA t	
	F calculado	F crítico $\alpha=0.05$	Varianza	t calculado	t crítico $\alpha=0.05$
1	7.778	19.000 n.s.	Homogénea	48.668	2.776 *
4	17.927	19.000 n.s.	Homogénea	102.308	2.776 *
7	3.821	19.000 n.s.	Homogénea	102.996	2.776 *
10	3.103	19.000 n.s.	Homogénea	97.771	2.776 *
13	1.379	19.000 n.s.	Homogénea	73.962	2.776 *
16	1.461	19.000 n.s.	Homogénea	66.066	2.776 *
19	1.005	19.000 n.s.	Homogénea	92.243	2.776 *
22	1.007	19.000 n.s.	Homogénea	61.019	2.776 *
25	13.993	19.000 n.s.	Homogénea	190.373	2.776 *

n=3 (tres muestras), (a): tiempo expresado en días, (): Existe diferencia estadística significativa, (n.s.): No existe diferencia estadística significativa.*

La **TABLA 6.5** muestra que al realizar la prueba F, del día 1 al 25 no existió diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ debido a que el $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, por lo tanto se acepta la hipótesis nula y con ello se afirma que las varianzas son homogéneas. Luego se realizó la prueba de t, la cual indica que existió diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ debido a que el $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ y esto coincide con la **TABLA 6.2**, donde se observa que la cantidad acumulada de selenio IV en raíces de T2>T1.

La biacumulación de selenio (IV) en los tratamiento T1 y T2 (**TABLA 6.2.** y **FIGURA 6.5**) en hojas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) denota que cuando las concentraciones suministradas son mayores, la translocación y transporte a hojas se incrementa llegado un punto de quiebre debido a la alta toxicidad y probablemente a la volatilización de selenio bajo la forma orgánica. En el tratamiento T1, la acumulación inicia el día 4 con $12.235 \pm 0.296 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y hubo incremento casi constante hasta el día 13 en donde la cantidad acumulada fue de $45.715 \pm 0.715 \text{ mg.Kg}^{-1}$, a partir de ese instante se inicia la etapa de acumulación masiva hasta el día 22 cuya

cantidad acumulada fue de $113.167 \pm 1.676 \text{ mg.Kg}^{-1}$, luego surge una leve reducción de la cantidad acumulada a $108.226 \pm 2.206 \text{ mg.Kg}^{-1}$. Mientras que en el tratamiento T2, la acumulación inicia el día 4 manteniéndose constante hasta el día 10 cuya concentración acumulada fue de $44.177 \pm 0.652 \text{ mg.Kg}^{-1}$, luego surge un incremento de acumulación masiva hasta el día 13 cuya cantidad acumulada fue de $132.709 \pm 1.540 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y mantenerse constante hasta el día 19 en donde alcanzó una cantidad acumulada de $200.952 \pm 1.457 \text{ mg.Kg}^{-1}$, a partir de ese instante se inicia un reducción de la acumulación de selenio hasta el día 25 en donde la acumulación fue de $90.067 \pm 0.640 \text{ mg.Kg}^{-1}$, probablemente este suceso se deba a la toxicidad y volatilización del selenio.

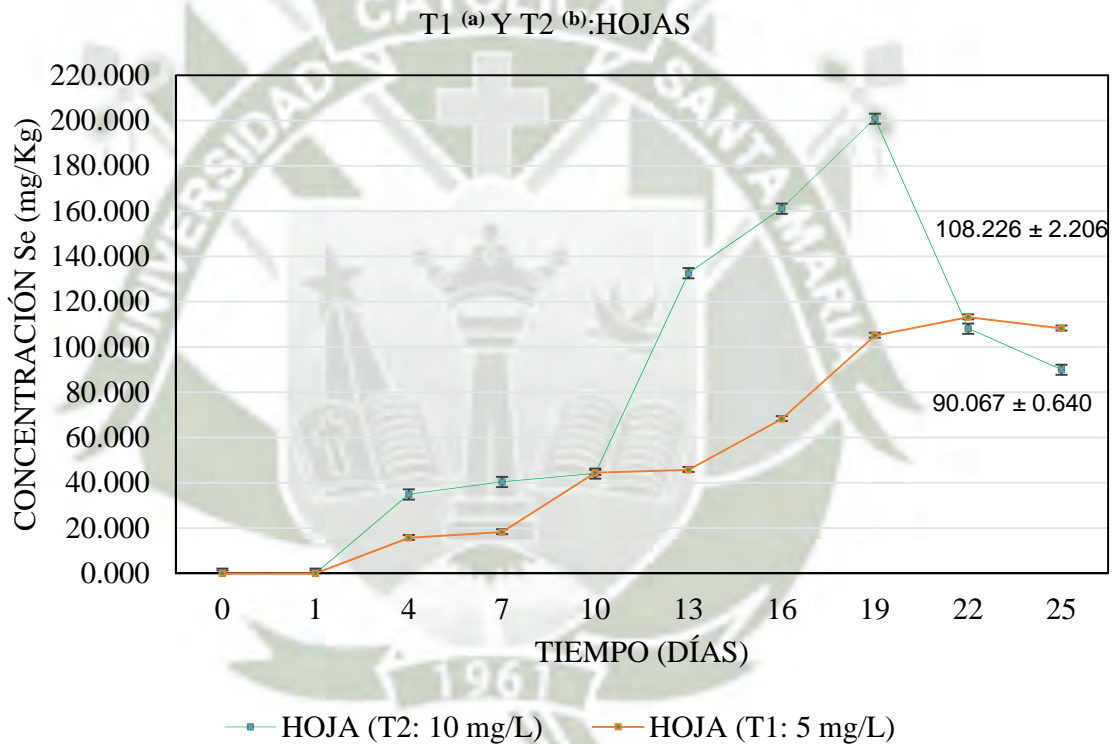


FIGURA 6.5. Curva de bioacumulación de selenio (IV) utilizando los promedios de hojas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) durante 25 días de experimentación. (a) 5 mg.L^{-1} . (b) 10 mg.L^{-1} .

En los tratamientos T1 y T2, se realizó una comparación para verificar si existió diferencia estadística significativa entre las concentraciones acumuladas de hojas de *Bacopa monnieri* L.

(Hisopo de agua) a concentraciones de 5 y 10 mg.L⁻¹ de selenito pentahidratado (Na₂SeO₃.5H₂O). Los resultados se observan en la **TABLA 6.6**.

TABLA 6.6. Análisis estadístico para los tratamientos T1 y T2 (hojas).

T ^(a)	PRUEBA F			PRUEBA t	
	F Calculado	F crítico $\alpha=0.05$	Varianza	t calculado	t crítico $\alpha=0.05$
1	-	-	-	-	-
4	0.585	19.000 n.s.	Homogénea	23.310	2.776 *
7	2.300	19.000 n.s.	Homogénea	42.174	2.776 *
10	0.341	19.000 n.s.	Homogénea	3.315	2.776 *
13	6.834	19.000 n.s.	Homogénea	82.863	2.776 *
16	0.859	19.000 n.s.	Homogénea	90.544	2.776 *
19	0.103	19.000 n.s.	Homogénea	48.079	2.776 *
22	12.942	19.000 n.s.	Homogénea	6.075	2.776 *
25	14.418	19.000 n.s.	Homogénea	17.675	2.776 *

n=3 (tres muestras), (a): tiempo expresado en días, (): Existe diferencia estadística significativa, (n.s.): No existe diferencia estadística significativa.*

La **TABLA 6.6** muestra que al realizar la prueba F, del día 4 al 25 no existió diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ debido a que el $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, por lo tanto se acepta la hipótesis nula y con ello se afirma que las varianzas son homogéneas. Luego se realizó la prueba de t, la cual indica que existió diferencia estadística significativa a un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ debido a que el $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ y esto coincide con la **TABLA 6.2**, donde se observa claramente que la cantidad acumulada de selenio IV en hojas de T2>T1.

El selenio es un elemento traza presente en el medio ambiente, se encuentra bajo la forma de selenio elemental (Se²⁻), seleniuro (Se⁰), selenito (SeO₃²⁻), selenato (SeO₄²⁻) y selenio orgánico [Fernández-Martínez y Charle, 2009; Goh y Lim, 2004]. Sin embargo la disponibilidad del selenio es un factor importante a tener en cuenta ya que la planta absorbe el selenio bajo la forma inorgánica de selenato (SeO₄²⁻) y selenito (SeO₃²⁻); y bajo la forma orgánica como

selenometionina y otras formas no identificadas e insolubles en agua [Kopsell *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008]. Para nuestro experimento se utilizó la especie inorgánica selenito pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), el cual se encuentra en estado de oxidación +4 y es soluble en solución acuosa siendo disponible para *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua); se sabe que existen dos mecanismos de transporte de iones: flujo de masas y difusión; con respecto al flujo de masas es el transporte de iones como resultado de la absorción de agua por la planta y su transpiración; y el transporte de iones por difusión pueden ser por mecanismos activos y pasivos [Nátr, 2002].

El selenito (SeO_3^{2-}) ingresa por los pelos radiculares de la planta utilizando el transporte activo; su ingreso requiere de un anión (SeO_3^{2-}) y catión (Na^+), habiendo un gasto de energía debido al ingreso en contra del gradiente electroquímico de una molécula de H^+ y ello requiere un gasto de energía, donde se utiliza una molécula de ATP (trifosfato de adenosina) que se reduce a ADP + Pi (difosfato de adenosina + fosfato inorgánico) [Arvy, 1993; Zayed *et al.*, 1994; Terry *et al.*, 2000 y Sors *et al.*, 2005]; luego se produce la translocación hacia la parte aérea de la planta, sin embargo el selenito (SeO_3^{2-}) tiende a acumularse en las raíces, siendo detectado pocas especies inorgánicas en la savia del xilema [Li *et al.*, 2008]. En el xilema el selenito (SeO_3^{2-}) sufre un proceso de reducción a seleniuros, y este se transforma en ácidos selenoicos, tales como la selenocisteína y selenometionina; estos son metabolizados a seleno-adenosil-selenometionina; y mediante varios procesos bioquímicos son convertidos a especies metiladas que son volátiles, entre ellas la metilselenometionina y metilselenocisteína [Dumont *et al.*, 2000; Pilon-Smits *et al.*, 2010].

Existe evidencia referida a la utilización de especies vegetales acuáticas y terrestres que son de gran utilidad para acumular metales pesados y metaloides como el selenio. Bañuelos y Lin, (2004) utilizaron la canola (*Brassica napus* var. Flageo) con fines de evaluar su capacidad de absorción de selenio utilizando sedimento y suelo como sustrato en diferentes proporciones (3:0, 2:1, 1:2 y 0:3) teniendo en cuenta que el sedimento se encuentra contaminado con selenio, luego de 14 días se determinó que la cantidad de selenio acumulado en dicha especie vegetal tuvo un rango de concentraciones entre 13 y 72 $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$; para nuestro experimento se utilizó la macrófita Hisopo de agua (*Bacopa monnieri* L.) bajo condiciones de un sistema hidropónico con una solución nutritiva de Hoagland y el contaminante selenito de sodio (Na_2SeO_3) durante un periodo de 25

días, obteniendo cantidades bioacumuladas superiores a la canola; sin embargo en nuestro sistema el selenio se encuentra bajo el estado de oxidación de IV, mientras que el sedimento contaminado con selenio pueden existir otros estados de oxidación y competencia por otros aniones,

Hussain et al., (2011) evaluó la capacidad de *Bacopa monnieri* L. para bioacumular mercurio y cadmio en condiciones de medio nutritivo de Hoagland durante un periodo de 50 días, encontrando que a partir de una concentración de $10 \mu\text{M}$ de Hg^{2+} y $30 \mu\text{M}$ de Cd^{2+} , la cantidad acumulada en la planta fue de $204 \pm 5.7 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Hg^{2+} y $565 \pm 12.8 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de Cd^{2+} ; siendo mayor acumulación de Cd^{2+} en raíces y menor en hoja. En el caso de nuestro experimento sucede algo similar ya que la mayor cantidad de acumulación de SeO_3^{2-} se da a nivel de raíces que en la parte aérea, y esto va depender mucho del mecanismo de ingreso, translocación y la competencia con otros aniones que se presenta en el sistema hidropónico como los sulfatos (SO_4^{2-}).

Mechora et al., (2013) determinó la absorción de selenio bajo estado de oxidación +4 a concentraciones de $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ y 10 mg.L^{-1} en la macrófita acuática *Potamogeton perfoliatus*; encontrando que durante en 4 días de exposición al contaminante, la cantidad acumulada fue de $28 \pm 0.86 \mu\text{g.g}^{-1}$ y $555 \pm 8.00 \mu\text{g.g}^{-1}$ respectivamente. *Mechora et al., (2014)* determino a través de un monitoreo de macrófitas en varias localidades en Eslovenia que estas acumulan selenio, especialmente las macrófitas *Veronica anagallis-aquatica* con $1.507 \mu\text{g.g}^{-1}$ y *Fontinalis antipyretica* con $3.038 \mu\text{g.g}^{-1}$; así el estudio es una evidencia de que las macrófitas son plantas acuáticas que pueden utilizarse para acumular metales y metaloides, para nuestro experimento los resultados fueron positivos ya que existió una bioacumulación de selenito en la macrófita Hisopo de agua (*Bacopa monnieri* L.) bajo condiciones de sistema hidropónico.

Sasmaz et al., (2015) determinó la eficiencia de remoción de cobre, plomo, zinc y arsénico del agua de una galería minera ubicada en Keban (Turquía) utilizando *Lemna gibba* L. y *Lemna gibba* L. por un periodo de 8 días; inicialmente las concentraciones encontradas en el agua fueron de 67, 7.5, 7 230 y $96 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente; obteniendo como eficiencia de remoción 87% en el día 2 y el 36% en el día 3 de Cu, 1 259% en el día 2 y el 1 015% el día 2 de Pb; 628% en el día 3 y el 382% en el día 3 de Zn, y 7 070% en el día 3 y 19.709% en el día 2 de As; por lo que

la lenteja de agua demostró tener la capacidad de reducir los contaminantes del agua procedente de una galería minera.

Así para nuestro experimento es importante mencionar que se utilizó a *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) que es una macrófita acuática procedente de los Humedales de Mejía ubicado en la costa del departamento de Arequipa, en los distritos de Mejía y Dean Valdivia y su extensión es de 690.6 hectáreas e incluye varios tipos de hábitats: totorales, pantanos, monte ribereño, gramadales y playas arenosas. Además estos humedales tienen mucha importancia debido a que cumplen una función valiosa para las aves migratorias como sitio de descanso y alimentación. Y los resultados obtenidos en la **TABLA 6.2** indican que *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) tiene la capacidad de “bioacumular” mayor cantidad de selenio (IV) en raíces que en hojas.

Gupta et al., (2000) hace mención que son consideradas plantas acumuladoras aquellas que en tejido vegetal contienen de 100 a 10 000 mg Se.kg⁻¹ de materia seca, y en este grupo se incluyen las especies Astrálogo, Machaeranthera, Haplopappus y Stanleya ya que crecen en suelos contaminados con un contenido de selenio > 5 mg.L⁻¹ de suelo y son responsables de selenosis de los animales de pastoreo. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) tuvo la capacidad de absorber cantidades > 100 mg Se.kg⁻¹, por ello es considerada una planta bioacumuladora.

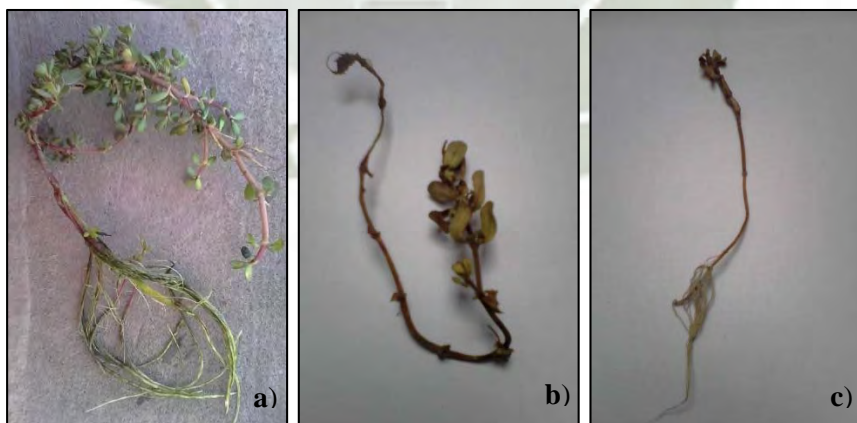


FIGURA 6.1. a) Tratamiento control, mostró un crecimiento y desarrollo de manera normal. b) T2 (5 mg.L⁻¹), tratamiento con síntomas de clorosis, necrosis, abscisión e inhibición de la biomasa y su crecimiento. c) T2 (10 mg.L⁻¹), tratamiento con síntomas de necrosis, senescencia, abscisión e inhibición de la biomasa y crecimiento de manera normal.

CONCLUSIONES

1. Durante la propagación de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) después de 45 días de trasplante, la solución súper húmica + solución nutritiva de Hoagland obtuvo 42.110 ± 2.041 plantas, mientras que los demás tratamientos obtuvieron valores menores iguales a 31.890 ± 6.308 plantas.
2. Las condiciones óptimas para la propagación de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) denotan que bajo condiciones de invernadero el rango de temperatura óptimo fue de $17.5 - 21.8^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa de $59.3 - 60.1\%$.
3. El método por voltamperometría fue validado para determinar selenio (IV) en hojas y raíces, siendo lineal con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.999, en un rango de intensidad de -23.742 ± 0.475 y -170.754 ± 1.434 nA, además de ser preciso y tener una exactitud aceptable.
4. El bioensayo de toxicidad demostró que al ser expuesta a una concentración de 20 mg.L^{-1} , la macrófita Hisopo de agua (*Bacopa monnieri* L.) muestra menor ciclo vital y mayor sintomatología de clorosis, necrosis, senescencia y abscisión de hojas; mientras que a una concentración igual o por debajo de 10 mg.L^{-1} muestra un mayor ciclo vital y un retraso en la aparición de sintomatología de toxicidad en raíces y hojas.
5. Se determinó el selenio en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) bajo la forma de selenio (IV) cuya cantidad bioacumulada fue mayor en raíces que en hojas para ambos tratamientos.
6. La máxima capacidad de bioacumulación de selenio (IV) para ambos tratamientos en raíces se registró a los 25 días con $174.689 \pm 1.665 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y $282.935 \pm 1.695 \text{ mg.Kg}^{-1}$ respectivamente; mientras que la bioacumulación en hojas para el tratamiento T1 se registró a los 22 días con $113.167 \pm 1.676 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y para el tratamiento T2 se registró a los 19 días con $200.952 \pm 1.457 \text{ mg.Kg}^{-1}$.

SUGERENCIAS

1. Sería recomendable utilizar otras especies de selenio para realizar el estudio de bioacumulación en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) bajo condiciones de invernadero.
2. Realizar el trabajo de investigación en diferentes estaciones del año, para verificar si la bioacumulación en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) es homogénea durante todo un periodo anual.
3. Utilizar a *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) bajo condiciones de campo, es decir realizar ensayos en sitios contaminados con selenio, para evaluar si posee la capacidad de bioacumular este metal.
4. *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) demostró ser eficiente para la bioacumulación de selenio (IV) y es una especie vegetal óptima para remediación de lechos acuáticos contaminados, sería importante determinar los genes implicados y mediante ingeniería genética estos puedan ser manipulados e insertados en otras especies vegetales.



UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA

ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRÍA EN QUÍMICA DEL MEDIO AMBIENTE



Capacidad fitorremediadora de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) en aguas contaminadas con selenio (Se) bajo condiciones de invernadero. Arequipa, 2014.

Proyecto de tesis presentado por el Bachiller:

JOEL LUCIO MAMANI LÓPEZ

Para optar el grado académico de Maestro en Química
del Medio Ambiente

Arequipa, Perú

2014

CAPITULO I

I. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 ENUNCIADO DEL PROBLEMA

Determinar la capacidad de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) para bioacumular selenio bajo condiciones de invernadero.

1.2 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

El selenio es considerado un oligoelemento no metálico que se encuentra de manera natural en el medio ambiente producto de erupciones volcánicas, erosión de rocas y suelos; sin embargo las actividades antropogénicas como la agricultura, minería, las centrales termoeléctricas, la quema de combustibles fósiles, la refinería del petróleo y minerales metálicos generan emisiones gaseosas y vertimiento de efluentes cuya composición química se presentan bajo la forma de óxidos de selenio (SeO_x), seleniuros (Se^{2-}), selenio elemental (Se^0), selenitos (SeO_3^{2-}) y selenatos (SeO_4^{2-}) [Combs y Gray, 1998; USEPA, 1998; Sappington, 2002; Hamilton, 2004; Fernández-Martínez y Charlet, 2009; Tuzen y Sari, 2010].

Por otro lado, el selenio en bajos niveles es un nutriente esencial para plantas y seres vivos, el origen del problema es los altos niveles de selenio y su movimiento en el ambiente ya que puede bioacumularse en alimentos, peces y la vida silvestre acuática generando así un proceso de biomagnificación a través de la cadena trófica [Tveitnes *et al.*, 1996; New South Wales Environmental Protection Agency, 1999; Jawaharlal Nehru University, 2000; Moscow Lomonosov State University, 2001].

En la región Arequipa, Provincia de Islay se encuentra ubicada la cuenca del río Tambo así como el Santuario Nacional de las Lagunas de Mejía en donde se reportó una alta concentración de metales pesados como arsénico, boro, cadmio, mercurio, plomo y selenio, producto de fuentes naturales y antropogénicas que se generan durante el curso del río Tambo [Calle, 2000].

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Uno de los objetivos de la maestría en Química del Medio Ambiente es ensayar con microorganismos y plantas regionales para la biorremediación de suelos y lechos acuáticos contaminados. Teniendo en cuenta dicho objetivo se plantea utilizar especies vegetales acuáticas para reducir las concentración de contaminantes en el medio ambiente [Greipsson, 2011].

Puesto que los métodos físicos y químicos sufren limitaciones como el alto costo, mano de obra, irreversibles cambios del ambiente contaminado y alteración de la flora y fauna del lugar; es necesario investigaciones para desarrollar una tecnología rentable, eficiente y favorable al medio ambiente para la remediación de suelos y lechos acuosos contaminados con metales pesados (plomo, cadmio, mercurio, cromo, arsénico, selenio, etc.) y contaminantes orgánicos (hidrocarburos aromáticos polinucleares, bifenilos policlorados y pesticidas); la fitorremediación considerada una tecnología rentable, novedosa, eficiente y amigable con el ambiente [Suresh y Ravishankar, 2004; Leduc y Terry, 2005; Chehregani y Malayeri, 2007; Odjegba y Fasidi, 2007; Vangrosveld *et al.*, 2009; Lone *et al.*, 2011 y Sarma, 2011].

Con el estudio de la fitorremediación se comprobó que existen especies vegetales acuáticas como *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) que son capaces de bioacumular metales pesados. Por lo tanto el proyecto de investigación tiene como objetivo determinar la capacidad de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) para bioacumular selenio de una solución hidropónica contaminada con selenio (IV), bajo condiciones de invernadero.

CAPITULO II

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA

El vertimiento de efluentes procedente de las actividades agropecuarias, mineras, industriales y petroquímicas generan una serie de impactos negativos sobre los ecosistemas acuáticos [Daskalakis y O'Connor, 1995, Zhang y Liu, 2002, Ruiz *et al.*, 2005 y Xu *et al.*, 2014]. La composición química de estos efluentes se caracteriza por tener metales traza (As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Pb) que son particularmente preocupantes debido a su bioacumulación, toxicidad y persistencia en el medio ambiente [Simpson y Batley, 2007; Wang y Rainbow, 2008, Cai *et al.*, 2011, Hu *et al.*, 2013 y Wang *et al.*, 2015].

Además estos metales traza se acumulan en los sedimentos, que actúan como sumideros finales para diversos contaminantes químicos y fuentes secundarias potenciales, pueden ser liberados de nuevo en columnas de agua en condiciones ambientales cambiantes [Roberts, 2012, Hill *et al.*, 2013 y Wang *et al.*, 2015]. Una vez absorbido por organismos acuáticos, los metales traza se pueden convertir en complejos que son más tóxicos que no sólo puedan suponer un riesgo para los organismos acuáticos, también pueden causar problemas de salud humana a largo plazo e incluso puede dañar el ecosistema [Wang y Rainbow, 2008, Dou *et al.*, 2013 y Wang *et al.*, 2015].

2.2 METALES PESADOS

Se definen “metales pesados” a aquellos elementos químicos que poseen una densidad igual o superior a 5 g.cm^{-3} y cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos), su presencia en la corteza terrestre es menor al 0,1% y casi siempre menor al 0,01% [Vardanyan y Ingole, 2006]. Se clasifican en: metales traza tóxicos (arsénico, cadmio,

plomo, mercurio, níquel, etc.), metales traza probablemente esenciales (vanadio) y metales traza esenciales (cobre, cobalto, hierro, manganeso, selenio y zinc) [Muñoz-Olivas y Camara, 2001].

2.2.1 FUENTES DE METALES PESADOS

El origen de los metales pesados procede de fuentes naturales y antropogénicas. Las fuentes naturales más significativas son la erosión de minerales y la actividad volcánica; mientras que como fuentes antropogénicas se incluyen la minería, fundición de metales, galvanoplastia, uso de pesticidas y fertilizantes, biosólidos de la agricultura, vertimiento de lodos, desechos industriales, la deposición atmosférica, etc. [Bautista, 1999; Modaihsh *et al.*, 2004, Chehregani y Malayeri, 2007; Fulekar *et al.*, 2009; Sabiha-Javied *et al.*, 2009; Wuana y Okieimen, 2011].

En fuentes naturales los metales pesados pueden encontrarse en los minerales primarios y coprecipitados con los minerales secundarios. Entiéndase “Minerales primarios” como los constituyentes de las rocas y “Minerales secundarios” como la cristalización de los productos del intemperismo (coloides); en la **TABLA 2.1** y **TABLA 2.2** se muestran ambos tipos de minerales asociados a metales pesados [Bautista, 1999].

TABLA 2.1. Minerales primarios asociados a metales pesados.

MINERALES PRIMARIOS SULFUROSOS	Arsenopirita	Esfarelita (ZnS)	Galena (PbS)	Calcopirita (CuFeS ₂)	Pirita (FeS ₂)
METALES PESADOS ASOCIADOS	As, Co, Mn y Ni.	Sb, Sn, Te y Ti.	Ag, Au, As, Ba, Bi, Cr, Hg, Se y Ni.	Ag, Co, Ge, In, Mn, Ni, Se, Sn.	Ag, Co, Ge, In, Mn, Ni, Se, y Sn.

Fuente: Bautista, 1999.

TABLA 2.1. Minerales secundarios asociados a metales pesados.

MINERALES SECUNDARIOS	Carbonatos de calcio	Óxidos de manganeso	Esmectitas	Óxidos de hierro	Vermiculitas
METALES PESADOS ASOCIADOS	V, Mn, Fe, Co, Cd y Pb.	Fe, Co, Ni, Zn y Pb.	Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co y Ni.	V, Mn, Cu, Zn y Mo.	Ti, Mn y Fe.

Fuente: Bautista, 1999.

Las fuentes antropogénicas son producidas por los humanos ya que debido a diversas actividades agrícolas, industriales, mineras, etc. se producen distintos de emisiones y vertimientos se caracterizan por el contenido de metales pesados tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. A continuación en la **TABLA 2.3** se observan algunos metales pesados que se encuentran en diversas fuentes antropogénicas.

TABLA 2.3. Fuentes antropogénicas de metales pesados.

METALES PESADOS	FUENTES
Arsénico	Subproducto minero, pesticidas, residuos químicos.
Cadmio	Industria, minería, otros.
Cromo	Industria de curtiembres, otros.
Cobre	Residuos industriales, minería, otros.
Hierro	Aguas ácidas de mina.
Plomo	Combustibles, plomería, minería.
Manganeso	Industria.
Mercurio	Industria, minería, combustión del carbón.
Molibdeno	Industria
Selenio	Minería, combustión del carbón, agricultura, otros.
Plata	Procesos fotográficos, galvanoplastia.
Zinc	Plomería, minería, galvanoplastia.

Fuente: Bautista, 1999; Dávila, 2013.

2.3 SELENIO

2.3.1 PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS DEL SELENIO

El selenio es un elemento químico que pertenece al grupo VI de la tabla periódica cuyo símbolo es Se, su número atómico es 34 y su masa atómica $78,96 \text{ g mol}^{-1}$. Es considerado un metaloide ya que posee características de un metal y un no metal; sus propiedades físicas y químicas se asemejan a del azufre (S) y telurio (Te). Sus estados de oxidación más importantes son: -2, -1, 0, +4 y +6. Presenta varias formas alotrópicas; las más populares son un polvo rojo amorfo, un material cristalino de color rojo y una forma cristalina gris llamado selenio metálico [Chemistry Explained, 2015].

2.3.2 ESPECIACIÓN Y QUÍMICA DEL SELENIO

El selenio es un elemento traza no metálico presente en el medio ambiente bajo la forma de seleniuro (Se^{2-}), selenio elemental (Se^0), selenito (SeO_3^{2-}), selenato (SeO_4^{2-}) y selenio orgánico. La especiación del selenio en medio de agua se rige a condiciones redox, pH, disponibilidad de sorción en superficies y procesos de biológicos [Fernández-Martínez y Charle, 2009; Goh y Lim, 2004].

La **IMAGEN 2.1** es un diagrama que indica las diferentes formas inorgánicas de selenio bajo la interacción del pH y el potencial redox. El selenio (VI) es la forma completamente oxidada del selenio y puede estar presente en solución como biselenato (HSeO_4^-) y selenato (SeO_4^{2-}) con un valor de pKa estimado de $1,8 \pm 0,1$ [Seby *et al.*, 2001], el selenato predomina en forma oxidante, es muy soluble y con limitada capacidad de adsorción y precipitación.

El selenito se encuentra en un rango de potencial redox moderado y en el ambiente a un pH neutro [Fernández-Martínez y Charle, 2009; Goh y Lim, 2004]. En solución acuosa, el selenio (IV) se encuentra como ácido débil bajo las formas de ácido selenioso (H_2SeO_3),

biselenito (HSeO_3^-) y selenito (SeO_3^{2-}) con valores de pK_a de $2,7 \pm 0,06$ para $\text{H}_2\text{SeO}_3/\text{HSeO}_3^-$ y $8,54 \pm 0,04$ para $\text{HSeO}_3^-/\text{SeO}_3^{2-}$ [Seby *et al.*, 2001].

En lechos acuosos, las formas predominantes de selenio son HSeO_3^- o SeO_4^{2-} , bajo condiciones de reducción u oxidación en el medio ambiente respectivamente. En tratamiento de aguas, la especiación del selenio puede ser notablemente afectada por la presencia de otros iones metálicos [Torres *et al.*, 2011].

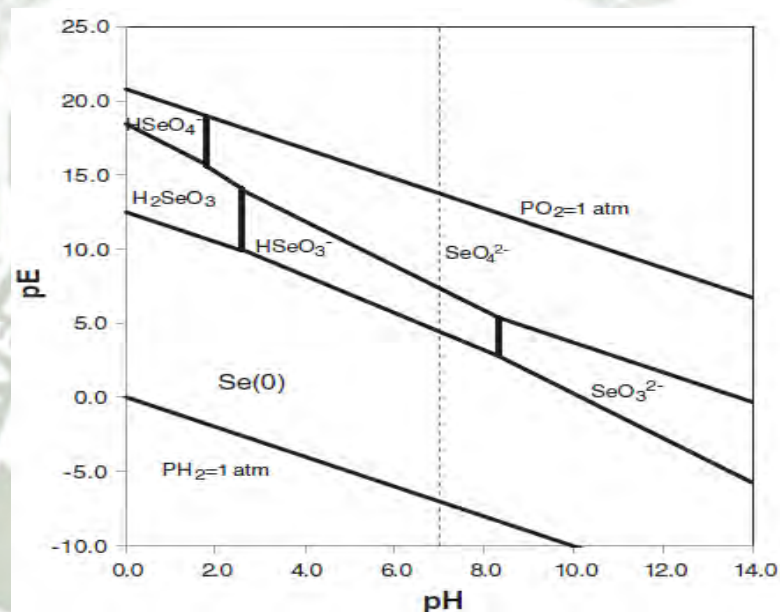


IMAGEN 2.1. Formas estables de selenio inorgánico bajo diferentes condiciones de pH y potenciales redox (pE).

2.4.2 FUENTES NATURALES Y ANTROPOGÉNICAS

A) FUENTES NATURALES

El selenio forma parte de la corteza terrestre, se encuentra distribuido de manera natural en aire, agua, suelos y alimentos. En suelos el selenio puede encontrarse en un rango de concentraciones de $0,01$ a 2 mg.Kg^{-1} , mientras que en zonas seleníferas su concentración está por encima de 2 mg.L^{-1} [Fernández-Martínez y Charlet, 2009;

Floor y Roman-Ross, 2012; Sigrist *et al.*, 2012]. También se encuentra distribuido en aguas superficiales con rango de concentraciones de 0,02 a 0,08 mg.L⁻¹ y en aguas subterráneas los niveles son más elevados debido a erosión de rocas. Y por último se encuentra distribuido en la atmósfera procedente de la actividad volcánica cuyo rango de concentraciones son de 0,01 a 1 mg.m⁻³ [Fordyce, 2013]. En alimentos, el selenio puede sustituir al azufre debido a su similitud fisicoquímica, por lo que las verduras, pollo, pescado y otros alimentos se encuentran en un rango de concentraciones de 10 a 20 mg.Kg⁻¹ [Klapec *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2009].

B) FUENTES ANTROPOGÉNICAS

En la combustión de carbón en instalaciones de generación de energía, se produce material particulado y gases que son emitidos a la atmósfera, el selenio constituye un elemento traza volátil bajo la forma de óxidos de selenio (SeO_x) [Yhan *et al.*, 2001]. El agua residual procedente la actividad minera contribuye como fuente de contaminación ya que los niveles de concentración van de 3 µg.L⁻¹ a 12 mg.L⁻¹ [Wasewar *et al.*, 2009]. La agricultura es otra actividad que a través de sus labores agrícolas genera agua de drenaje con alto contenido de sales, se reportaron caso en el Valle de San Joaquín, California en donde las concentraciones de selenio está por encima de 350 µg.L⁻¹.

2.4.3 IMPACTO AMBIENTAL

Varios estudios revelaron que altas concentraciones de selenio (Se) fueron observados en mamíferos, peces y aves en todo el mundo [Lemly, 2004], y debido a diferentes actividades antropogénicas como la minería, refinerías, aguas residuales municipales, fundiciones metálicas y agua de riego agrícola; estos estudios fueron reportados en el embalse de Kesterson, Valle de San Joaquín, California [Ohlendorf, 1989, 2002]. Ciertos animales rumiantes y monogástricos sufren intoxicación crónica (selenosis) en áreas seleníferas [Hartikainen, 2005]. En la comunidad acuática, los peces resultan ser

muy sensibles; la Comunidad Británica encontró niveles altos de selenio en los tejidos de trucha debido a la movilización de selenio en los ríos cuyo fuente es la actividad minera [McDonald y Strocher, 1998]. Otros estudios recientemente encontraron efectos teratogénicos, médulas y malformaciones craneofaciales fueron reportados en peces que habitan en un ecosistema acuático contaminado por aguas residuales procedentes de plantas de carbón para generar energía [Lemly, 2014]. Así el selenio representa un riesgo para la vida acuática, ya que se puede biomagnificar a través de la cadena trófica [Lemly, 2004, 2014].

2.5 FITORREMEDIACIÓN

La fitorremediación se refiere básicamente a la utilización de especies vegetales y microorganismos del suelo para reducir las concentración de contaminantes en el medio ambiente [Greipsson, 2011]. Esta tecnología se puede utilizar para reducir la concentración de metales pesados (plomo, cadmio, mercurio, cromo, arsénico, selenio, etc.), radionucleidos y contaminantes orgánicos (hidrocarburos aromáticos polinucleares, bifenilos policlorados y pesticidas). Es considerada una tecnología rentable, novedosa, eficiente y amigable con el ambiente [Clemens, 2001; Suresh y Ravishankar, 2004; Leduc y Terry, 2005; Chehregani y Malayeri, 2007; Odjegba y Fasidi, 2007; Vangrosveld *et al.*, 2009; Lone *et al.*, 2008 y Sarma, 2011]. La idea de esta tecnología es estéticamente agradable y tiene buena aceptación por el público, además es considerado de bajos costos en comparación a otros métodos de remediación convencional [Vance *et al.*, 2009].

2.5.1 TÉCNICAS Y/O ESTRATEGIAS DE FITORREMEDIACIÓN

A) FITOEXTRACCIÓN

También conocida como fitoacumulación, fitoabsorción y fitosecuestración, es considerada la absorción de contaminantes del suelo y/o agua por las raíces de las

plantas, su translocación del contaminante hacia la biomasa aérea [Sekara *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2006 y Rafati *et al.*, 2011].

B) RIZOFILTRACIÓN

La rizofiltración es la eliminación de contaminantes de aguas superficiales y residuales [Mukhopadhyay y Maiti, 2010]. En rizofiltración los contaminantes son adsorbidos y absorbidos por las raíces de las plantas, por lo que el movimiento del contaminante es minimizado hacia las aguas subterráneas o superficiales [Mesjasz-Prybylowicz *et al.*, 2004].

C) FITOESTABILIZACIÓN

La fitoestabilización o fitoinmovilización es la utilización de determinadas plantas para la estabilización de los contaminantes en suelos contaminantes [Singh, 2012]. Esta técnica se utiliza para reducir la movilidad y la biodisponibilidad de contaminantes del medio ambiente, evitando así su migración hacia el agua subterránea y su entrada en la cadena alimenticia [Erakhrumen, 2007].

Las plantas pueden inmovilizar metales pesados en los suelos a través de la absorción de las raíces, la precipitación, complejación y la reducción de valencia de metales en la rizosfera [Barceló y Poschenrieder, 2003; Ghosh y Sing, 2005; Yoon *et al.*, 2006; Wuana y Okieimen, 2011]. Las plantas generalmente tienen la capacidad de convertir metales peligrosos a un estado relativamente menos tóxico y reducir el posible estrés del metal y daños. Sin embargo la fitoestabilización no es una solución permanente, se trata de una estrategia de gestión para inactivar los contaminantes potencialmente tóxicos [Vangrosveld *et al.*, 2009].

D) FITOVOLATILIZACIÓN

Es la absorción de contaminantes del suelo por las plantas, su conversión a la forma volátil y posterior liberación a la atmósfera. Esta técnica se puede utilizar para los contaminantes orgánicos y algunos metales pesados como el mercurio y selenio. Sin embargo, su uso está limitado por el hecho de que no elimina completamente el contaminantes; solo se transfiere de un segmento (suelo) a otro (atmósfera) desde donde se puede volver a depositar. La fitovolatilización es la más polémica de las tecnologías de fitorremediación [Padmavathiamma y Li, 2007].

E) FITODEGRADACIÓN

Es la degradación de contaminantes orgánicos por plantas con ayuda de enzimas tales como la deshalogenasa y oxigenasa; no es dependiente de microorganismos rizosféricos [Vishnoi y Srivastava, 2008]. Las plantas pueden acumular sustancias xenobióticas orgánicas de ambientes contaminados y desintoxicar a través de actividades metabólicas. La fitodegradación es limitado debido a que los metales pesados no son biodegradables a comparación de los contaminantes orgánicos [Doty *et al.*, 2007].

F) RIZODEGRADACIÓN

Se refiere a la descomposición de los contaminantes orgánicos en el suelo por microorganismos en la rizósfera [Muknopadhyay y Maiti, 2010]. Las plantas puede estimular la actividad microbiana sobre 10 a 100 veces mayor en la rizósfera por la secreción de exudados que contienen hidratos de carbono, aminoácidos, flavonoides.

La liberación de nutrientes que contienen exudados por raíces de las plantas proporciona fuentes de carbono y nitrógeno a los microbios del suelo y crea un ambiente rico en nutrientes en el que se estimula la actividad microbiana. Además

los sustratos orgánicos para facilitar el crecimiento y las actividades de los microorganismos rizosféricas, las plantas también liberan ciertas enzimas capaces de degradar contaminantes orgánicos del suelo [Kuiper *et al.*, 2004; Yadav *et al.*, 2010].

G) FITODESALINIZACIÓN

Se trata de una técnica que emergió recientemente [Zorrig *et al.*, 2012]. La fitodesalinización se refiere a la utilización de plantas halófitas para la eliminación de sales de los suelos afectados por la sal con el fin de permitir el crecimiento normal de la planta [Manousaki y Kalogerakis, 2011; Sakai *et al.*, 2012]. Por ejemplo *Suaeda maritima* y *Sesuvium portulacastrum* podría son utilizados con éxito para acumular cloruro de sodio (NaCl) de suelos altamente salinos y permitirles para la producción agrícola después de unos pocos cultivos repetidos y la cosecha [Ravindran *et al.*, 2007].

2.5.2 FITOEXTRACCIÓN DE METALES PESADOS

La técnica de fitorremediación más útil y principal es la fitoextracción cuyo objetivo es la eliminación de metales pesados y metaloides a partir de suelos contaminados, sedimento y lechos acuosos [Cluis, 2004; Cherian y Oliveira, 2005; Milic *et al.*, 2011]. La eficiencia de la fitoextracción depende de muchos factores como la biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo, las propiedades del suelo, la especiación de los metales pesados en el suelo y las especies predominantes para absorción en la plantas. Las plantas adecuadas para fitoextracción deberían tener las siguientes características [Mejárez y Bulow, 2001; Tong *et al.*, 2004; Adesodun *et al.*, 2010; Sakakibara *et al.*, 2011; Shabani y Sayadi, 2012]:

- Alta tasa de crecimiento y desarrollo.
- Alta producción de biomasa.
- Ampliamente distribuida y sistema radicular muy ramificado.

- Capacidad de acumulación de metales pesados.
- Translocación de metales pesados de raíz a parte aérea de la planta.
- Tolerancia a los efectos tóxicos de los metales pesados.
- Resistencia a patógenos y plagas.
- Fácil de cultivar y cosechar.
- Repulsión a los herbívoros para evitar la contaminación a la cadena alimenticia.

2.5.3 ABSORCIÓN, METABOLISMO DE SELENIO EN PLANTAS

La absorción y acumulación de selenio (**FIGURA 2.1**) está en función de la especie química, la presencia de iones competitivos y la afinidad de la planta para absorber y metabolizar el selenio [Zayer *et al.*, 1998; Terry *et al.*, 2000]. Las especies químicas que son disponibles para especies vegetales son el selenito (SeO_3^{2-}), selenato (SeO_4^{2-}) y selenio orgánica; el selenito (SeO_3^{2-}) compite con otros aniones como los sulfatos (SO_4^{2-}) y fosfatos (PO_4^{2-}), se ha determinado por investigaciones que ambos ingresan a la planta mediante un transportador de sulfato ubicado en la membrana plasmática de la raíz [Terry *et al.*, 2000].

El selenato (SeO_4^{2-}) se reduce en selenito (SeO_3^{2-}) para luego reducirse en seleniuro (Se^{2-}), en dicho proceso bioquímico de reducción interviene la enzima glutatión [Dumont *et al.*, 2006]. El seleniuro se transforma en aminoácidos de selenio como la selenocysteina y selenometionina; y ambas pueden ser metabolizadas a metilselenosisteina y metilselenometionina, sin embargo estas especies pueden convertirse en especies volátiles como el dimetilseleniuro. El transporte de selenio de raíces a hojas es dependiente de la forma suministrada de selenio en el medio nutritivo de crecimiento. Por ejemplo Zayed *et al.*, (1998) demostró que el selenato (SeO_4^{2-}) es fácilmente transportado en comparación al selenito (SeO_3^{2-}); esto explica que el selenito (SeO_3^{2-}) es pobremente transportado hacia hojas ya que es reducido rápidamente a selenometionina.

Un estudio realizado en rábano, dio como resultado que plantas suministradas con selenito (SeO_3^{2-}), el 95% de contenido de selenio se transformó en especies orgánicas de selenio; mientras que rábanos crecidos en medio de selenato (SeO_4^{2-}) se encontró que solo el 38% se transformó en especies orgánicas de selenio y el resto se conservó como selenato (SeO_4^{2-}) [Pedrero *et al.*, 2006].

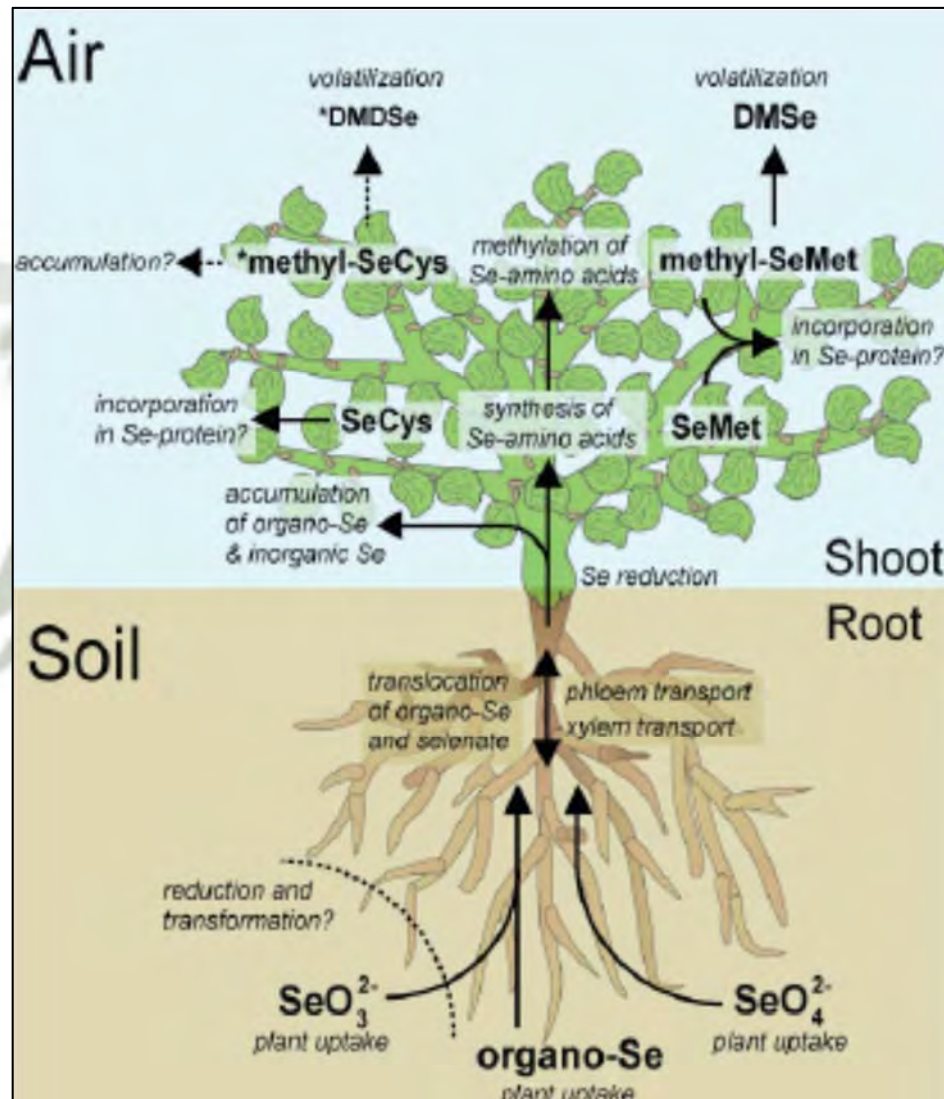


FIGURA 2.1. Principales vías de ingreso de selenio. Los procesos de transporte, metabolismo y transformación de selenio en plantas.

2.5.5 LIMITACIONES DE LA FITORREMEDIACIÓN

Aunque la fitorremediación es un enfoque prometedor para la remediación de los suelos y lechos acuáticos contaminados por metales pesados, sino que surge ciertas limitaciones [Tong *et al.*, 2004; LeDuc y Terry, 2005; Karami y Shamsuddin, 2010; Mukhopadhyay y Maiti, 2010; Naees *et al.*, 2011; Ramamurthy y Memarian, 2012]:

- La eficiencia de la fitorremediación de la mayoría de especies vegetales hiperacumuladoras metálicas está limitada por la tasa de crecimiento y la biomasa.
- Limpieza de lugares contaminados a largo plazo.
- Dificultad en la movilización de la fracción más fuertemente unido de iones metálicos de suelo, es decir limitada por la disponibilidad de contaminantes en el suelo.
- Es aplicable a sitios con bajos niveles de contaminación por metales pesados, debido a que el crecimiento de la planta es inhibido en suelos contaminados a altas concentraciones.
- Hay un riesgo de contaminación de la cadena alimenticia en caso de una inadecuada gestión.

2.6 PLANTAS ACUÁTICAS

Las plantas acuáticas desempeñan un papel importante en los sistemas acuáticos en todo el mundo, ya que proporcionan alimentos y hábitat para los peces, la vida silvestre y los organismos acuáticos. Algunas de estas plantas no nativas, se introducen en nuevos hábitat y se convierten en malezas que obstaculizan, generan molestia en humanos y alteran la función de algunos ecosistemas acuáticos.

Crecen de manera parcial o completamente en el agua, se encuentran en zonas poco profundas de ríos y lagos, esta zona poco profunda se denomina zona de litoral donde la luz penetra lo suficiente para apoyar la fotosíntesis de las plantas. Se pueden clasificar en tres grupos [Gettys *et al.*, 2009]:

A) PLANTAS EMERGENTES

Son aquellas que habitan en aguas menos profundas, donde hay presencia de sedimento, sus hojas se extienden por encima de la superficie del agua. Ejemplo: *Phragmites spp.*, *Typha spp.*, *Carex spp.*, *Alternanthera philoxeroides*.

B) PLANTAS CON HOJAS FLOTANTES

Estas plantas crecen a profundidades intermedias, algunas especies de este grupo se originan del sedimento, pero otros son de libre flotación con raíces que cuelgan sin anclaje en la columna de agua. El desarrollo y crecimiento de sus hojas es flotante de manera plana a la superficie del agua. Ejemplos: *Ceratophyllum demersum*, *Eichhornia crassipes*, *Salvinia spp.*, *Pistia stratiotes*, *Azolla spp.*, *Lemna spp.*, *Nymphaea spp.*, *Nuphar spp.*, *Nymphoides spp.*

C) PLANTAS SUMERGIDAS

Tienen su origen en el sedimento y habitan en la franja más profunda de la zona litoral, donde la penetración de luz es suficiente para apoyar la fotosíntesis de la planta, su crecimiento y desarrollo se produce totalmente dentro de la columna de agua. Ejemplos: *Potamogeton spp.*, *Ruppia spp.*, *Zannichellia spp.*, *Hydrilla verticillata*, *Ranunculus penicillatus var. calcareus*, *Elodea spp.*, *Myriophyllum spp.*

2.6.1 PLANTAS ACUÁTICAS EN LA MEJORA DE LA CALIDAD DEL AGUA

Las plantas acuáticas son conocidas por su capacidad de acumulación e hiperacumulación de metales pesados [Outridge y Noller, 1991] y metal flujos áspera esos ecosistemas [Jackson *et al.*, 1994 y St-Cyr *et al.*, 1994]. Varios estudios han demostrado que las plantas acuáticas son muy eficaces en la eliminación de metales pesados del agua contaminada. La asimilación de los nutrientes de la planta y su posterior recolección son otro mecanismo para la eliminación de contaminantes. Bajo costo y fácil mantenimiento hacen que la sistema de la planta acuática atractiva a utilizar [Kanabkaew y Puetpaiboon, 2004].

Por lo tanto, las plantas acuáticas se aplican cada vez más como un tratamiento viable para aguas residuales municipales. Recientemente, se ha habido un interés creciente en el uso de las raíces de metal de acumulación y rizomas de plantas vasculares acuáticas y semi-acuáticos para la eliminación de metales pesados de corriente contaminada [Kanabkaew y Puetpaiboon, 2004].

Por ejemplo: la capacidad de las plantas acuáticas como la lenteja de agua (*Lemna spp.*) para eliminar metales pesados tóxicos del agua están bien documentados y juega un papel importante en la extracción y acumulación de metales de las aguas residuales [Chong *et al.*, 2003]. Otro ejemplo es *Eichhornia crassipes* se ha utilizado con éxito en el sistema de tratamiento de aguas residuales para mejorar la calidad del agua la reducción de los niveles de nutrientes orgánicos e inorgánicos [Sutcliffe, 1962].

2.7 *Bacopa monnieri* L. (HISOPO DE AGUA)

2.7.1 TAXONOMÍA

El género *Bacopa* deriva de un nombre aborigen de la Guayana Francesa, mencionada por Jean Baptiste Christophore Fusee Aublet en 1775 en su libro “*Histoire*

des Plantes de la Guiane Françoise” [Flora of China Editorial Committee, 1998], a continuación en la **TABLA 2.4** se muestra la taxonomía de la especie vegetal:

TABLA 2.4. Taxonomía de la macrófita Hisopo de agua.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnolipsida</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Scrophuriales</i>
Familia	<i>Plantaginaceae</i>
Género	<i>Bacopa</i> <u>AUBL. 1775</u>

2.7.2 DESCRIPCIÓN

Es una planta que crece bajo agua, sobre la superficie del agua o en sustrato. Por lo general produce numerosos tallos ramificados rastreros que se extienden a través de suelos fangosos o flotan en aguas poco profundas. Estos tallos producen raíces y están cubiertos por pelos relativamente largos. La hojas son pequeñas (8-20 mm de largo y 15.6 mm de ancho), brillantes y color verde que se localizan de pares a lo largo de los tallos. Estas hojas son sin pecíolo y en forma redondeada con márgenes y puntas redondeadas. Las flores son pequeñas azuladas-púrpura (alrededor de 10 mm de largo) están dispuestas por separado en las horquillas de la hoja cerca en el extremo de las ramas, cada flor tiene dos brácteas verdes en su base y los pétalos se forman en un tubo corto con cinco lóbulos extendidos en la punta. El fruto es una pequeña cápsula (4.5 mm de largo) que contiene numerosas pequeñas semillas. Sin embargo, por lo general permanece oculto en el interior de los sépalos persistentes [Technigro, 2012)].

2.7.3 ECOLOGÍA Y HÁBITAD

El Hisopo de agua es una pequeña planta acuática nativa de Sudamérica (Brasil, Paraguay, etc) que también se conoce como bacopa peluda. Se cultiva como planta de acuario y se está estableciendo actualmente en los sitios húmedos en las zonas costeras del este de Australia. Esta especie ha demostrado la capacidad para formar densas tasas de vegetación en los humedales, a lo largo de cursos de agua y en las represas de granja. Si no se controla, puede desplazar a especies nativas y formar un monocultivo. Esto no sólo reduce la biodiversidad de estas áreas, pero puede también disminuir la calidad del agua y restringir el movimiento del agua [Technigro, 2012].

3. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

3.1 FITORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS

- Hussain *et al.*, (2011) evaluaron el potencial de la *Bacopa monnieri* L. en una solución nutritiva de Hoagland contaminada con cloruro de mercurio (HgCl_2) y cloruro de cadmio (CdCl_2) por separado, 50 días después la capacidad de acumulación de dichos metales en el tejido de *Bacopa monnieri* L. fue de $66.3 \pm 1.04 \mu\text{g.g}^{-1}$ de tejido de planta para HgCl_2 y $72.30 \pm 1.04 \mu\text{g.g}^{-1}$ de tejido de planta para CdCl_2 .
- Mishra *et al.*, (2006) determinaron la capacidad de acumulación de cadmio a diferentes concentraciones 0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 μM en la planta acuática *Bacopa monnieri* L., siendo la máxima capacidad de acumulación de dicho metal en raíces 80.6%, tallo 11.9% y hojas 7.4%; a una concentración de 100 μM de cadmio $9240.11 \mu\text{g.g}^{-1}$ después de 7 días de exposición.
- Harguinteguy *et al.*, (2015) evaluaron la capacidad de acumulación de plomo y zinc en la planta acuática *Myriophyllum aquaticum* y *Egeria densa* por un periodo de 7 días; la los niveles máximos de acumulación de plomo se registraron a una concentración de 15

mg.L⁻¹ en ambas especies, con una acumulación de $3798,9 \pm 1032.5$ mg.kg⁻¹ para *M. aquaticum* y 2302.56 ± 882.1 mg.kg⁻¹ para y *E. densa*; mientras que el nivel de acumulación de zinc máximo fue a una concentración de 20 mg.L⁻¹ en ambas especies, con una acumulación de 2348.4 ± 713.2 mg.kg⁻¹ para *M. aquaticum* y 1083.6 ± 568.1 mg.kg⁻¹ para *E. densa*.

- Sasmaz *et al.*, (2015), utilizaron 50 g de muestras de *Lemna gibba* L. y *Lemna minor* L. para evaluar la capacidad para remoción de Cu, Pb, Zn y As. Siendo las cantidades acumuladas por ambas especies en un periodo de 8 días para Cu de 2156.76 mg.Kg⁻¹ y 1672.86 mg.Kg⁻¹; Pb de 8526.47 mg.Kg⁻¹ y 12127.72 mg.Kg⁻¹; Zn de 9339.90 mg.Kg⁻¹ y 487138.4 mg.Kg⁻¹.

3.2 FITORREMEDIACIÓN DE SELENIO

- Hussain *et al.*, (2011) encontró que ciertas macrófitas tienen la capacidad de acumular selenio de lechos acuáticos contaminados. Por ejemplo *Hippuris vulgaris*, acumuló 739 - 1276 ng.g⁻¹, *Lemna minor* acumuló 392 - 416 ng.g⁻¹, *Fontinalis antipyretica* acumuló 1355 - 1987 ng.g⁻¹, *Chiloscyphus polyanthus* acumuló 1477 ng.g⁻¹. Destacando estas especies macrófitas como acumuladoras del metaloide selenio.
- Bañuelos y Lin, (2004) evaluaron la cantidad de acumulación de selenio en *Brassica napus* var. Hyola 420, *Festuca arundinacea* var. Aun Triumph, *Sporobolus airoides* y *Spartina patens* var. Flageo; siendo la cantidad acumulada de selenio en dichas especies de 72.3 mg.Kg⁻¹, 36.2 mg.Kg⁻¹, 13.3 mg.Kg⁻¹ y 14.5 mg.Kg⁻¹ respectivamente.

Los diversos antecedentes mostrados anteriormente muestran que existen especies vegetales que tienen la capacidad de bioacumular metales pesados y selenio en sus tejidos, especialmente las plantas acuáticas sin importancia económica o que son consideradas malezas pueden ser utilizadas como una estrategia para mitigar la contaminación de ecosistemas acuáticos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la bioacumulación de selenio en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) bajo condiciones de invernadero.

4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Propagar a *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) bajo condiciones de invernadero.
- B) Determinar las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) en sistema hidropónico.
- C) Realizar una validación analítica voltamperométrica para determinar selenio en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua).
- D) Realizar un bioensayo de toxicidad en la macrófita Hisopo de agua (*Bacopa monnieri* L.) para determinar el nivel de tolerancia.
- E) Evaluar la concentración de selenio en la macrófita Hisopo de agua (*Bacopa monnieri* L.).
- F) Determinar la máxima capacidad bioacumuladora de selenio en la macrófita Hisopo de agua (*Bacopa monnieri* L.).

5. HIPÓTESIS

Dado que diversas investigaciones realizadas demuestran que la utilización de especies vegetales acuáticas poseen la capacidad de acumular metales pesados, es probable que *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) sea eficiente para bioacumular selenio bajo condiciones de invernadero.

CAPITULO III

3. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

3.1.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El proyecto de investigación planteado tiene como finalidad bioacumular selenio en raíces y hojas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua), específicamente selenito pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Por otra parte se estudiarán la adaptación, propagación, tolerancia o prueba de toxicidad a concentraciones elevadas de selenito pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y la máxima capacidad de acumulación de selenio en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua).

3.2 EQUIPOS Y MATERIALES

3.2.1 EQUIPOS

- Agitador magnético digital
- Balanza analítica OhausPioneer® Tm
- Digestor microondas MARS
- Equipo Barnstead® Easy Purell (agua 18.2 MΩ)
- Equipo ultrasonida Branson® 2510-E
- Estufa de esterilización
- Estación voltamperométrica 979 VA Computrace Metrohm®
- Pipetas automáticas de 20 µL, 200 µL y 1000 µL (Eppendorf)
- pHmetro digital (827 pH, Metrohm)
- Sistema de digestión UV 705 UV Digester Metrohm®
- Sonicador (Branson 2510)

- Refrigeradora
- Termohigrómetro

3.2.2 MATERIALES

A) MATERIAL VEGETAL

- *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua)

B) MATERIAL DE VIDRIO

- Bagueta
- Estanques de vidrio
- Fiolas (10 mL, 25 mL y 1000 mL)
- Pipetas graduadas (1 mL, 2 mL y 10 mL)
- Pipetas volumétricas (1 mL, 2 mL y 10 mL)
- Goteros
- Probeta graduada (50 mL)
- Tubos de ensayo (13 x 100 mm)
- Vasos de licuadora
- Vaso precipitado (100 mL y 250 mL)

C) REACTIVOS

- Ácido clorhídrico 60% suprapuro (cc). Merck
- Ácido nítrico 65% suprapuro (cc). Merck
- Ácido sulfúrico p.a. (cc). Merck
- Agua destilada
- Agua potable
- Agua ultrapura (18.2 MΩ)

- Cloruro de potasio 3M
- Nitrógeno UHP (99,9999%)
- Solución estándar de selenio suprapuro. Merck
- Solución estándar de cobre suprapuro. Merck
- Solución hidropónica nutritiva a base de macroelementos y microelementos.

D) OTROS

- Bandejas de poliestireno expandido (tecnopor)
- Balde de plástico
- Espátula de plástico
- Gradilla para tubo de ensayo
- Guantes de látex
- Malla raschel (90%)
- Mortero
- Papel aluminio
- Papel kraft
- Piedras difusoras expandidas
- Polietileno (20 mm)
- Recipientes de plástico grandes (38 cm x 75 cm x 14 cm)
- Recipientes de plástico pequeños
- Tips de 5-20 μL y de 100-1000 μL
- Vasos de digestión de teflón

3.2.3 ANÁLISIS Y METODOLOGIA

A) RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La especie vegetal para el estudio será recolectada de riachuelos y lagunas en el distrito de mejilla, provincia de Islay, departamento de Arequipa.

B) IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

Después de la recolección de la especie vegetal y con el fin de verificar la taxonomía de la especie vegetal, se consultará a un especialista del HERBARIUM AREQUIPENSE (HUSA) para su respectiva caracterización taxonómica e identificación.

C) DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN INVERNADERO

Dado que las condiciones ambientales deben ser homogéneas para evitar la interacción con factores externos, será necesario el diseño de un invernadero tipo capilla con las dimensiones de 3 m de altura, 2.5 m de ancho y 3.5 m largo; este será construido con fierro y enmascarado con malla antiáfido.

C) ETAPA DE ADAPTACIÓN DE *Bacopa monnieri* L. (HISOPO DE AGUA)

Después de la etapa de recolección, las plántulas deberán ser colocadas en agua potable por un periodo de 30 días hasta lograr la adaptación por completo de la especie vegetal a condiciones de Arequipa (ciudad).

D) PROPAGACIÓN DE *Bacopa monnieri* L. (HISOPO DE AGUA)

Las plántulas deberán ser lavadas con hipoclorito de sodio al 5% para eliminar algunas algas, hongos y bacterias impregnados en la raíz, sólo serán seleccionadas aquellas plantas sanas y vigorosas. Posteriormente se planteó evaluar tres tipos de tratamientos para evaluar durante 45 días, el sistema nutritivo más eficiente y adecuado para obtener la mayor cantidad de plantas en el menor tiempo posible; siendo los tratamientos: T1 (solución Súper húmica), T2 (solución nutritiva de Hoagland) y T3 (solución Súper húmica + solución nutritiva de Hoagland).

E) VALIDACIONES

▪ Validación electrónica

➤ Test de la linealidad

Conectar la celda al soporte 797 VA uniendo: el cable del electrodo auxiliar AE al conector AE, el cable del electrodo de referencia RE al conector RE, el cable del electrodo de trabajo WE al conector WE-L y cargar el método (Test 797_L del directorio de métodos e iniciar el método). Se registrara una línea diagonal.

➤ Test de desempeño del pico

Conectar la celda al soporte 797 VA uniendo: el cable del electrodo auxiliar AE al conector AE, el cable del electrodo de referencia RE al conector RE, el cable del electrodo de trabajo WE al conector WE-D y cargar el método (Test 979_D del directorio de métodos e iniciar el método). Se registrará la curva y se analiza.

▪ Validación química

Agregar 20 mL de agua ultrapura en la celda electroquímica, 0.5 mL de KCl a 3M y 100 μ L de solución estándar de ión plomo (1.000 g.L^{-1}). Cargar el método (Test Pb in ion estándar solution.mth) desde el directorio métodos e iniciar el modo DME. La solución es desgasificada, el voltamperograma es registrado tres veces y aparece la ventana de adición estándar.

▪ Validación analítica

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece mediante estudio de laboratorio, que las características de desempeño del

método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas [USP, 2002]. El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado [ICH, 2002].

Para realizar una validación de procedimientos analíticos se requiere: instrumentos calificados y calibrados, métodos documentados, patrones de referencia confiables, analistas calificados e integridad de la muestra. Los parámetros de validación que serán desarrollados y evaluados para la validación de un método analítico para determinación de selenio serán: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación.

➤ Linealidad

Según la ICH, 2005; La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración del analito en muestras de un intervalo dado [INTI-Química, 2005].

Este procedimiento analítico será ejecutado por triplicado y cada medición constará de 6 adiciones estándar de 100 μL de una solución estándar de selenio preparada a 0.5 mg.L^{-1} . Inicialmente la celda electroquímica contendrá 10 mL de agua ultrapura, 100 μL de solución estándar de selenio a 0.5 mg.L^{-1} , 2 mL de una solución de una solución de sulfato de amonio al 10% ajustando a un pH 2.2 y 100 μL de solución estándar de cobre de 1000 ppm. La concentración final de hallará aplicando la siguiente ecuación:

$$CF = \frac{CE \times VE}{VF}, \text{ donde:}$$

CF: Concentración final (mg.L^{-1})

CE: Concentración del estándar utilizado (mg.L^{-1})

VE: Volumen estándar adicionado (L)

VF: Volumen final (L)

- Estadística de la linealidad

* Ecuación de la recta: Con la ecuación de la recta obtenemos el intercepto (a), el límite de la linealidad e intervalo, la pendiente (b), el coeficiente de correlación de pearson (r) y el coeficiente de determinación (r^2). La ecuación de la recta se define por $y = bx + a$

y: Intensidad (nA);

b: valor de la pendiente;

x: Concentración (mg.L^{-1});

a: Término independiente (intercepto).

Por otro lado se debe mencionar que los criterios de aceptación para la linealidad establecen que el coeficiente de determinación (r^2) debe ser $\geq 0,995$.

* Desviación estándar: La desviación estándar (sd) se determina por medio de:

$$Sd = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}, \text{ donde:}$$

n: número de medidas

X_i : Valor medido en el ensayo

\bar{X} : Estimador de la media poblacional (μ), calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}, \text{ donde:}$$

* Coeficiente de variación (%): Se determina en base al promedio (\bar{X}) y la desviación estándar.

$$CV = \frac{\bar{X}}{S_d} \times 100, \text{ donde:}$$

\bar{X} : Promedio de los factores respuesta

CV: Coeficiente de variación (%)

Sd: Desviación estándar de los factores respuesta

➤ Precisión

Según la AOAC, 2002; la precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor central y corresponde de concordancia entre los ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. Este parámetro tiene diferentes tipos de estudios: repetitividad (análisis para el mismo analista con la misma instrumentación), precisión intermedia (análisis los resultados en un laboratorio, pero en días distintos con analistas y equipos diferentes) y reproducibilidad (coincidencia en los resultados entre laboratorios).

- Desviación estándar: La desviación estándar (sd) se determina por medio de:

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}, \text{ donde:}$$

Sd: Desviación estándar

n: Número de medidas

X_i : Valor medido en el ensayo i

\bar{X} : Estimador de la media poblacional μ , calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}, \text{ donde:}$$

- Coeficiente de variación (%): Se determina en base al promedio (\bar{X}) y la desviación estándar (Sd).

$$CV = \frac{\bar{X}}{Sd} \times 100, \text{ donde:}$$

\bar{X} : Promedio de los factores respuesta

Sd: Desviación estándar de los factores respuesta

➤ Límite de detección y cuantificación

- Límite de cuantificación: Una característica del funcionamiento del método que suele expresarse como señal del valor (verdadero) de la medición que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (%) generalmente de 10 % o 6 %. Para ello se utiliza la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b \times \sqrt{n}}, \text{ donde:}$$

Y_{bl} : Estimador de la respuesta del blanco para calcular el LC y LD.

S_{bl} : Estimador correspondiente a la desviación estándar del blanco.

b : pendiente de la recta.

n : número de muestras.

- Límite de detección: enfocado a la menor concentración del analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, se expresa en unidades de concentración (% , ppm, ppb, etc.). Para ello se utiliza la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b \times \sqrt{n}}, \text{ donde:}$$

Y_{bl} : Estimador de la respuesta del blanco para calcular el LC y LD.

S_{bl} : Estimador correspondiente a la desviación estándar del blanco.

b: pendiente de la recta.

n: número de muestras.

➤ Exactitud

Capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una muestra. Hace referencia al valor que es aceptado como valor de referencia (certificado) y el valor encontrado (promedio) al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces. Para ello se utiliza la fórmula de recuperación que es:

$$R = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} * 100, \text{ donde:}$$

R: Recuperación (%)

\bar{X} :: Valor medido (mg.L⁻¹)

\hat{X} : Valor verdadero (mg.L⁻¹)

F) BIOENSAYO DE TOXICIDAD

Para el bioensayo de toxicidad se preparara 5 diluciones de 2 L en bandejas de plástico de 40 cm x 20 cm x 7 cm, las cuales tendrán diferentes concentraciones (0, 5, 10, 20 Y

30 mg.L⁻¹) de selenito de sodio pentahidratado (Na₂SeO₃.5 H₂O) en combinación con la solución nutritiva de Hoagland (10 mL de solución “A” y 4 mL solución “B”). Una vez preparadas las 5 en las bandejas de plástico, se colocará una plancha de poliestireno con 3 plantas de Hisopo de agua (*Bacopa* spp) durante un periodo de 15 días. A continuación se muestra los pesos calculados a diferentes concentraciones de selenito de sodio.

$$5 \text{ mg.L}^{-1}: \frac{262,96 \text{ g Na}_2\text{SeO}_3 \times 0,005 \text{ g Se}}{78,96 \text{ g Se} \times 1 \text{ L}} \times 2 \text{ L} = 0,0333 \text{ g Na}_2\text{SeO}_3$$

$$10 \text{ mg.L}^{-1}: \frac{262,96 \text{ g Na}_2\text{SeO}_3 \times 0,01 \text{ g Se}}{78,96 \text{ g Se} \times 1 \text{ L}} \times 2 \text{ L} = 0,0666 \text{ g Na}_2\text{SeO}_3$$

$$20 \text{ mg.L}^{-1}: \frac{262,96 \text{ g Na}_2\text{SeO}_3 \times 0,02 \text{ g Se}}{78,96 \text{ g Se} \times 1 \text{ L}} \times 2 \text{ L} = 0,1332 \text{ g Na}_2\text{SeO}_3$$

G) SISTEMA HIDROPÓNICO PARA FITORREMEDIACIÓN DE SELENIO

Para el experimento de fitorremediación es necesario tener en cuenta el nivel de tolerancia de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) a selenito de sodio pentahidratado (Na₂SeO₃.5 H₂O), por lo que las concentraciones finales estarán en base al bioensayo de toxicidad. Los medios nutritivos más el contaminante (selenito de sodio) serán preparados para un volumen de 10 L, en 9 recipientes de vidrio (30 x 30 x 40 cm). El contenido de cada recipiente de vidrio constará de agua potable, solución nutritiva de Hoagland (solución “A” y “B”) y selenito de sodio. Después de colocarán en el fondo del recipiente piedras difusoras que serán conectadas a bombas peristálticas para burbujear aire y mantener en movimiento constante la solución preparada. Finalmente se colocarán bandejas de poliestireno donde se colocarán 10 plantas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) por cada recipiente de vidrio.

H) DIGESTIÓN Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS

- Pre-secado de muestras

Las plantas serán recolectadas cuidadosamente de los sistemas hidropónicos y colocados en papel kraft para evitar que estas sufran algún tipo de contaminación. Luego serán expuestas al sol para eliminar el exceso de humedad y así reducir el tiempo y temperatura de secado, por un período de 24 - 48h.

- Secado de muestras

Luego del pre-secado las plantas serán divididas en parte aérea y radicular, para posteriormente ser llevadas a estufa y secadas a una temperatura no mayor a 90°C por un periodo de 2 horas.

- Digestión microondas

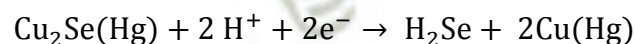
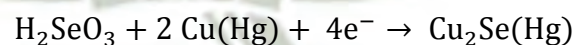
La técnica para este procedimiento será por digestión en envase cerrado asistida por microondas. Luego del secado las muestras son trituradas con ayuda de un mortero, posteriormente se pesará 20 ± 1 mg de la parte aérea y la parte radicular en tubos de digestión. Después de ello se agregará ácido nítrico suprapuro (HNO_3) y ácido clorhídrico suprapuro (HCl) en una proporción de 1:1.5 a cada tubo de digestión que contenga las respectivas muestras y estos serán colocados dentro del carrusel con su respectivo chaleco de protección para ser digeridos en el Digerstor microondas MARS con los siguientes parámetros: 15 minutos con una potencia de 1500 W y 15 minutos con una irradiación 1500 W.

Luego se debe esperar alrededor de 30 minutos, hasta que los tubos de digestión estén fríos por completo, para su apertura y así facilitar el siguiente proceso de reducción y así evitar pérdida de muestras.

- Proceso de reducción: Una vez terminada la digestión, es necesario agregar 0.5 mL de ácido clorhídrico suprapuro (HCl) para que todas las especies inorgánicas y orgánicas se transformen a selenio (IV); para lo cual en el digestor microondas MARS se tendrá que configurar los siguientes parámetros: 5 minutos con una potencia de 600 W y 10 minutos con una irradiación 900 W. Luego de terminada la etapa de reducción las muestras digestadas serán traspadas a fioas de 10 mL rotuladas y estas serán enrazadas con agua ultrapura. Todo el material usado como bisturís, utensilios empleados deben ser lavados con ácido nítrico a 2 M.

I) DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE “HISOPO DE AGUA”

El selenio es determinado por voltamperometría de redisolución catódica (CSV) utilizando un electrodo de trabajo que es la gota colgante de mercurio (HMDE), un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3 M. Seguidamente se realiza configuraciones en el software, los procedimientos se encuentran en el manual de Metrohm de la estación voltamperométrica 979. El selenio depositado en la solución electrolítica de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ al 10% ajustado a un pH de 2,2, junto con la adición de iones de cobre (Cu_xSe_y) sobre la superficie de gota de mercurio. El proceso de óxido-reducción que se da en la gota colgante de mercurio (HMDE) con el cobre (II) y selenio (IV) se muestra en la siguiente reacción:



- Preparación de la solución electrolítica

Para la elaboración de la solución electrolítica de sulfato de amonio al 10% ajustado a un pH de 2.2; se pesará 10 g. de sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄ en una balanza

analítica, luego será disuelto en agua ultrapura para que finalmente sea enrazado en una fiola de 100 mL. El ajuste de pH se realizará mediante el potenciómetro, que será previamente calibrado y se ira adicionando ácido clorhídrico (HCl) a 0.1 N, hasta alcanzar un pH deseado de 2.2 ± 0.1 .

- Preparación del estándar selenio a 0.5 mg.L^{-1}

A partir de una solución estándar de arsénico de 1000 mg L^{-1} se tomaran $5 \mu\text{L}$ de esta solución que será enrazada con ácido clorhídrico (HCl) a 0.05 N en una fiola de 10 mL.

- Preparación de EDTA a 0.1 M

Se pesará 3.722 g de EDTA, posteriormente se añade 10 mL de agua ultrapura y se lleva a un baño de sonicador por un periodo de 30 minutos para posteriormente enrazar a 100 mL con agua ultrapura.

- Análisis en la celda electroquímica

En la celda electroquímica se adicionará 10 mL de agua ultrapura, 2 mL de solución electrolítica de sulfato de amonio al 10%, $100 \mu\text{L}$ de muestra digerida, 1 mL EDTA y $100 \mu\text{L}$ de solución estándar de cobre a 1000 mg.L^{-1} . Posteriormente durante el análisis se agregará $100 \mu\text{L}$ de solución de selenio a $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ como adiciones estándar para corroborar la presencia de selenio en la muestra digerida.

J) DISEÑO EXPERIMENTAL

- Etapa de propagación de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua)

Para la etapa de propagación, el experimento constará de 3 tratamientos, los cuales son especificados con mayor claridad en el **CUADRO N° 4**.

TABLA 3.1. Tratamientos en estudio para la etapa de propagación de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua).

Tratamientos	Descripción
T1	Ácidos húmicos.
T2	Solución nutritiva de Hoagland.
T3	Ácidos húmicos + Solución nutritiva de Hoagland.

El diseño estadístico que se aplicara será un Diseño Completamente al Azar (DCA), el cual tendrá 3 tratamientos y 3 repeticiones, teniendo así un total de 9 unidades experimentales; cada unidad experimental estuvo constituida por 20 plántulas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua). Posteriormente a los resultados obtenidos se le hará un análisis de varianza (ANVA) y un test de Duncan a un nivel de $\alpha=0,05$ para determinar si existe diferencia estadística significativa entre tratamientos.

- Etapa de bioacumulación de selenio

Para la etapa de bioacumulación de selenio, el experimento constará sólo de 3 tratamientos, los cuales serán determinados en función del bioensayo de toxicidad y la tolerancia que demuestre *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) a las diferentes concentraciones de selenito de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) que fueron

planteadas anteriormente. La descripción de los tratamientos en estudio se describe en la **TABLA 3.2.**

TABLA 3.2. Tratamientos en estudio para la etapa de fitorremediación de selenio.

Tratamientos	Descripción
T0	Solución nutritiva de Hoagland
T1	Solución nutritiva de Hoagland + “x” mg.L ⁻¹ de selenito de sodio
T2	Solución nutritiva de Hoagland + “x” mg.L ⁻¹ de selenito de sodio

El diseño estadístico a aplicar será un diseño completamente al azar (DCA), el cual tendrá 3 tratamientos y 3 repeticiones, teniendo así un total de 9 unidades experimentales; cada unidad experimental estuvo constituida por 10 plántulas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua). Posteriormente sólo los tratamientos T1 y T2 serán comparados con la prueba de t de Student para comparar varianzas y la prueba de F de Fisher para determinar si existe diferencia significativa entre tratamientos, ambas pruebas serán verificadas a un nivel de $\alpha=0.05$. Para el análisis de los datos estadístico, se utilizará un software estadístico llamado Statgraphics Centurion XVI y Microsoft Excel 2013.

K) PARÁMETROS DE EVALUACIÓN

- Etapa de propagación
 - Se cuantificará el número de plantas que se obtienen a los 15, 30 y 45 días después de trasplante en los diferentes tratamientos que fueron propuestos anteriormente.

- Bioensayo de toxicidad
 - Se determinará el nivel de tolerancia de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) mediante un bioensayo de toxicidad.
 - Se evaluará características cualitativas cada 3 días envase a una escala de grado de toxicidad.
 - Se determinará la concentración acumulada en raíces y hojas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua).
- Bioacumulación de selenio
 - Se cuantificará concentración inicial y final en la solución nutritiva con selenito de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
 - Se determinará la concentración acumulada en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) en raíces y hojas con una frecuencia de cada 3 días y por un periodo de 25 días en los tratamientos.
 - Se determinará la máxima concentración de selenio en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) en hojas y raíces en los tratamientos en estudio.

3.2 CAMPO DE VERIFICACIÓN

3.2.1 UBICACIÓN ESPACIAL

El proyecto de investigación se llevará a cabo en el laboratorio del “Proyecto Mercurio” de la Universidad Católica Santa María.

3.2.2 UBICACIÓN TEMPORAL

La ejecución del proyecto de investigación estará comprendida entre el mes de Septiembre (2014) y Septiembre (2015).

3.2.3 UNIDADES DE ESTUDIO

A) ETAPA DE PROPAGACIÓN DE *Bacopa monnieri* L. (HISOPO DE AGUA)

TABLA 3.3. Número de plantas empleadas para la propagación y su muestreo por evaluación.

Población	Muestra
30 Plantas	3 Plantas

B) ETAPA DE FITORREMEDIACIÓN DE SELENIO

TABLA 3.4. Número de plantas empleadas para el proceso de fitorremediación y su muestreo por evaluación.

Población	Muestra
30 Plantas	3 Plantas

3.3 ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.3.1 ORGANIZACIÓN

- Permisos para acceso y uso del laboratorio del “Proyecto Mercurio”, pabellón H, laboratorio 202.
- Revisión bibliográfica.
- Diseño e instalación de invernadero.
- Validación de método analítico.
- Bioensayo de toxicidad.
- Bioacumulación de selenio.
- Digestión microondas.
- Evaluación y monitoreo de selenio.

3.5.2 RECURSOS

A) Recursos humanos

- Investigador: Bach. Joel Lucio Mamani López

B) Recursos físicos

- Invernadero en Urb. Tasahuayo J-14, distrito de José Luis Bustamante y Rivero.
- Laboratorio del “Proyecto Mercurio”, pabellón H, laboratorio 202.
- Biblioteca de Ingenierías de la Universidad Nacional de Santa María.
- Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de San Agustín.
- Internet

C) Recursos económicos

- Propios

3.5.3 VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS

- Se realizará una validación electrónica, química y analítica para el equipo de voltamperometría.
- Bioensayo en *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) para determinar su bioacumulación de selenio.
- Digestión y determinación por voltamperometría de selenio en raíz y hoja de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua).

3.5.4 CRITERIOS PARA EL MANEJO DE RESULTADOS

- Los resultados serán evaluados, discutidos y analizados con artículos científicos de revistas.



CAPITULO IV

4. CRONOGRAMA DE TRABAJO

Actividades	2014					2015									
	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sept.	Oct.
Aprobación del plan de tesis.	X	X													
Redacción de marco teórico.			X	X	X										
Recolección de datos.						X	X	X	X	X	X	X			
Estructuración de resultados.												X	X	X	
Informe final.															X





UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA Nº 18-2015-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra preservada de la planta presentada por el Ing. Agronomo Joel Lucio Mamani López de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Para la ejecución de su trabajo de maestría, "Bioacumulación de selenio utilizando la especie vegetal *Bacopa Monnieri* bajo condiciones de invernadero" las muestras fueron traídas al Laboratorio de Botánica, para la determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la especie y clasificación:

Division: **Magnoliophyta**
Clase: **Magnoliopsida**
Subclase: **Asteridae**
Orden: **Scrophulariales**
Familia: **Scrophulariaceae**
Género: ***Bacopa***
Especie: ***Bacopa monnieri* (L.) Pennell**

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen conveniente.

Arequipa 16 de Julio del 2015


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248674
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA - PERÚ

TABLA 2.1 Medidas utilizadas para el diseño y construcción de un invernadero tipo capilla.

Largo (m)	Ancho (m)	Altura (m)
3.0	2.5	3.5

TABLA 2.2. Análisis de varianza del número de plantas al día 1 durante la etapa de propagación de Hisopo de agua (*Bacopa monnieri* L.).

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F_{calculado}	F_{crítico}
Entre grupos	0.0997556	2	0.0500	1.32	5.143 n.s.
Intra grupos	0.2267	6	0.038		
Total (Corr.)	0.326489	8			

TABLA 2.3. Análisis de varianza del número de plantas al día 15 durante la etapa de propagación de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua).

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F_{calculado}	F_{crítico}
Entre grupos	113.473	2	56.737	61.28	5.143 *
Intra grupos	5.5556	6	0.926		
Total (Corr.)	119.029	8			

TABLA 2.4. Análisis de varianza del número de plantas al día 30 durante la etapa de propagación de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua).

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F _{calculado}	F _{crítico}
Entre grupos	337.501	2	168.751	151.37	5.143 *
Intra grupos	6.68893	6	1.115		
Total (Corr.)	344.19	8			

TABLA 2.5. Análisis de varianza del número de plantas al día 45 durante la etapa de propagación de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua).

Fuente	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrado Medio	F _{calculado}	F _{crítico}
Entre grupos	478.563	2	239.282	122.04	5.143 *
Intra grupos	11.7645	6	1.961		
Total (Corr.)	490.328	8			

TABLA 2.6. Lecturas de temperatura y humedad durante los meses de Mayo y Junio, 2015.

Mes	Temperatura mínima (°C)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura promedio (°C)	Humedad relativa (%)
Mayo	12.1	31.5	21.8	60.1
Junio	9.2	25.1	17.5	59.3

TABLA 2.7. Parámetros voltamperométricos del método.

Potencial de limpieza (s)	300		
Ciclos de condicionamiento			
Potencial de inicio (V)	0	Barrido	
Potencial final (V)	0		
Número de ciclos	0		
Pre tratamiento			
Potencial de limpieza (V)	-0.1	Potencial de inicio (V)	-0.3998
Tiempo de limpieza (s)	0.0	Potencial final (V)	-0.75
Potencial de deposición (V)	-0.3998	Tiempo de pulso (s)	0.04
Tiempo de deposición (s)	90	Paso de voltaje (V)	0.003967
Tiempo de equilibrio (s)	10	Tiempo de paso de voltaje (s)	0.1
		Velocidad de barrido (V/s)	0.0397

TABLA 2.8. Determinación de la linealidad para el método propuesto por voltamperometría para selenio (IV).

Cf (mg.L⁻¹)	I1 (nA)	I2 (nA)	I3 (nA)	$\bar{i} \pm s$ (nA)
0.004	-23.491	-23.445	-24.290	-23.742 ± 0.475
0.008	-47.344	-48.690	-49.844	-48.626 ± 1.251
0.011	-72.050	-74.770	-73.862	-73.561 ± 1.385
0.015	-93.181	-99.282	-97.480	-96.648 ± 3.135
0.018	-120.657	-121.840	-121.723	-121.407 ± 0.652
0.022	-151.955	-149.963	-148.270	-150.063 ± 1.845
0.025	-169.220	-170.981	-172.061	-170.754 ± 1.434

Cf: Concentración final, I: Intensidad, \bar{i} : Intensidad promedio, s: Desviación estándar.

TABLA 2.9. Datos del resumen del análisis estadístico de la linealidad.

Parámetros	Resultado
A	3.224
B	-6870.326
R	0.999
r^2	0.999
r^2 ajustado	0.999
Error típico	1.760
F	5513.172
Valor crítico	8.390E ⁻⁹
S_a	1.515
S_b	92.529
T_{exp_a}	2.128
T_{exp_b}	74.250
T crítico	6.608
a mín.	0.670
a máx.	7.118
b mín.	-7108.192
b máx.	-6632.485

TABLA 2.10. Registro de intensidades y su coeficiente de variación para la repetibilidad del método.

Cf (mg.L⁻¹)	I1 (nA)	I2 (nA)	I3 (nA)	$\bar{i} \pm s$ (nA)	C.V. (%)
0.004	-23.742	-24.722	-25.441	-24.232 ± 0.853	-3.519
0.008	-48.626	-48.132	-49.234	-48.379 ± 0,552	-1.141
0.011	-73.561	-75.451	-72.110	-74.506 ± 1.675	-2.249
0.015	-96.648	-98.422	-98.237	-97.535 ± 0.975	-1.000
0.018	-121.407	-122.101	-121.957	-121.754 ± 0.366	-0.301
0.022	-150.063	-147.437	-151.543	-148.750 ± 2.079	-1.398
0.025	-170.754	-172.101	-171.378	-171.378 ± 0.674	-0.393

Cf: Concentración final, I: Intensidad, \bar{i} : Intensidad promedio, s: Desviación estándar, C.V.: Coeficiente de variación.

TABLA 2.11. Valores determinados para el cálculo del porcentaje de recuperación para raíz y hoja de la especie vegetal Hisopo de agua (*Bacopa monnieri* L.).

MUESTRA	V (μL)	Ct mg.L⁻¹	Cd mg.L⁻¹	R (%)
Raíz	5	0.500	0.4516 ± 0.009	88.780
Hoja	5	0.500	0.4439 ± 0.012	88.417

V: Volumen añadido, Ct: Concentración teórica, Cd: Concentración determinada, R: Porcentaje de recuperación.

TABLA 2.12. Parámetros a tomar en consideración para determinar el límite de cuantificación y límite de detección.

b	Y_{bl}	S_{bl}	LC (ug.L⁻¹)	LD (ug.L⁻¹)
-6870.326	3.222	0.957	7.093*10 ⁻¹	3.353*10 ⁻¹

b: Pendiente, Y_{bl}: Desviación estándar de la pendiente, S_{bl}: Desviación estándar del blanco, LC: Límite de cuantificación, LD: Límite de detección.

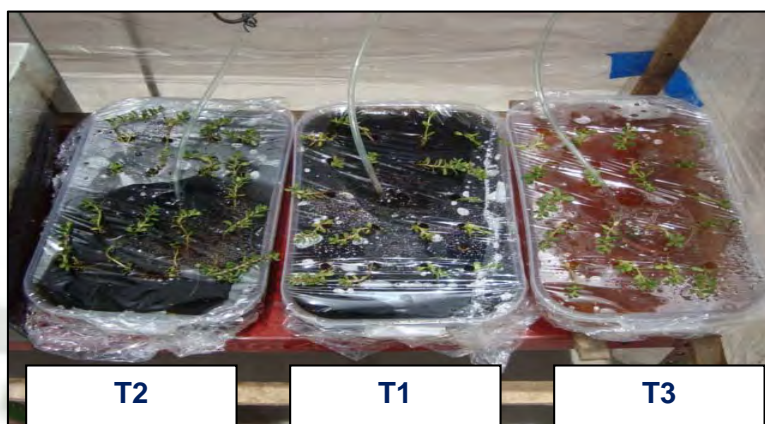


FIGURA 2.1. Propagación de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua) bajo condiciones de invernadero.

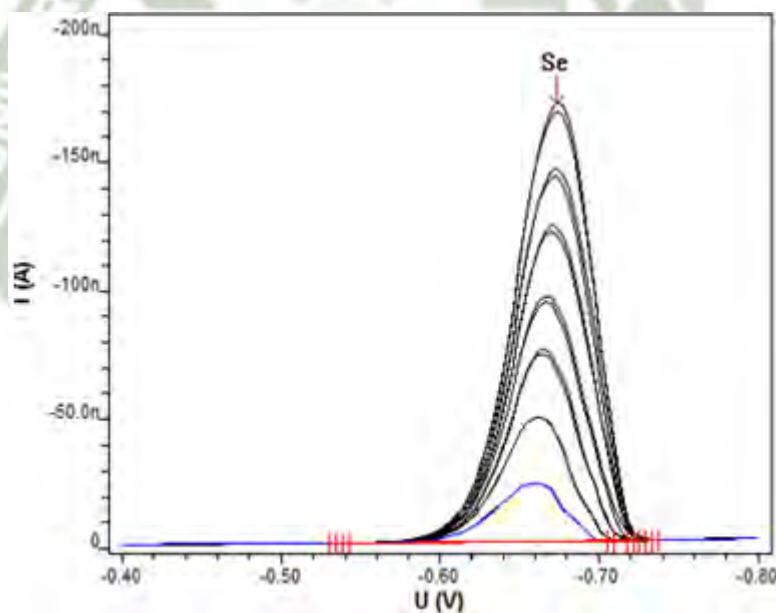


FIGURA 2.2. Voltamperograma con un incremento de picos simétricos que están en función de la intensidad de corriente (A) y la rampa de voltaje (V).



FIGURA 2.1. Estación voltamperométrica 797 VA Computrace utilizado para la determinación de selenio (IV).



FIGURA 2.2. Digestor microondas MARS utilizado para realizar las digestiones de raíces y hojas de *Bacopa monnieri* L. (Hisopo de agua).

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, L. y Agüero, R., 2006. Malezas acuáticas como componentes del ecosistema. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): p. 213-219.
2. Adesodun, J.K., Atayese, M.O., Agbaje, T., Osadiaye, B.A., Mafe, O. and Soretire, A.A., 2010. Phytoremediation potentials of sunflowers (*Tithonia diversifolia* and *Helianthus annuus*) for metals in soils contaminated with zinc and lead nitrates. *Water Air Soil Pollut.* 207, 195–201.
3. AOAC, 2002. Guía de laboratorio para validación de métodos químicos para suplementos alimenticios y botánicos. p. 1-38.
4. Arvy, M. P. Selenate and selenite uptake and translocation in bean-plants (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of experimental botany.* 1993, Vol. 44, Issue 263, p. 1083-1087.
5. Azcon, J. y Talón M., 2001. Fundamentos de fisiología vegetal. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. 83-85 p.
6. Bañuelos, G.S. and Lin, Z-Q., 2005. Phytoremediation management of selenium-laden drainage sediments in the San Luis Drain: a greenhouse feasibility study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 309-316
7. Barceló, J. and Poschenrieder, C., 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contrib. Sci.* 2, 333–344
8. Barko, J., Adams M. and Clesceri, N., 1986. Environmental factors and their consideration in the management of submerged aquatic vegetation: a review. *Vegetation* 123: pp. 13-37

9. Bautista, F., 1999. Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán, México. Vol 1: 35-38 p.
10. Cai, M.H., Lin, J., Hong, Q.Q., Wang, Y. and Cai, M.G., 2011. Content and distribution of trace metals in surface sediments from the northern Bering Sea, Chukchi Sea and adjacent Arctic areas. *Mar. Pollut. Bull.* 63, 523–527.
11. Calle, 2000. Informe de Evaluación del Proyecto Ecodesarrollo del Santuario Nacional de las Lagunas de Mejía y las Zonas de Amortiguamiento a la Embajada de Holanda. Sin publicar 15 p.
12. Campos, L., 2013. Fitorremediación de aguas contaminadas con selenio mediante el uso de la especie *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua). Tesis de Maestría en Química del Medio Ambiente. Universidad Carolina Santa María. p. 1-72.
13. Canellas, L.P. and Olivares, F.L., 2014. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 1, 1–11.
14. CETESB. Bioensaios Microbianos Aplicados no Controle de Contaminantes Tóxicos Ambientais; Serie Didáctica, PROCOP 1991, 1-75.
15. CG, W., 1980. Toxicology of selenium: a review. *Clin. Toxicol.* 17:171–230
16. Chehregani, A. and Malayeri, B.E., 2007. Removal of heavy metals by native accumulator plants. *Int. J. Agri. Biol.* 9, 462-465.
17. Chemistry Explained, 2015. Foundations and applications of selenium. 1 p.
18. Chen, T., Magen, H. and Riov, J., 1994. Humic substances originating from rapidly decomposing organic matter: properties and effects on plant growth.

19. Cherian, S. and Oliveira, M.M., 2005. Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9377-9390.
20. Chong, Y., Hu, H. and Qian, Y., 2003. Effects of inorganic nitrogen compounds and pH on the growth of duckweed. *J. Environ. Sci.*, 24:35-40.
21. Combs, G.F. and Gray, W.P., 1998. Chemo preventive agents: selenium. *Pharmacol. Ther.* 79, 179-192.
22. Curt, M., 2005. Macrófitas de interés en fitodepuración. p. 1-16
23. Daskalakis, K.D. and O'Connor, T.P., 1995. Normalization and elemental sediment contamination in the coastal United States. *Environ. Sci. Technol.* 29, 470-477.
24. Dávila, G., 2013. Contaminación de agua por metales pesados. Diapositivas
25. Doty, S.L., Shang, Q.T., Wilson, A.M., Moore, A.L., Newman, L.A. and Strand, S.E., 2007. Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian P450 2E1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6287-6291.
26. Dou, Y., Li, J., Zhao, J., Hu, B. and Yang S., 2013. Distribution, enrichment and source of heavy metals in surface sediments of the eastern Beibu Bay, South China Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 67, 137-145.
27. Dumont, E., Vanhaecke, F. and Cornelis, R., 2006. Selenium speciation from food sources to metabolites: A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1304-1323.

28. Erakhrumen, A.A., 2007. Phytoremediation: an environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation in developing countries. *Edu. Res. Rev.* 2, 151–156.
29. Estrada, J., 2010. Guía para la construcción de invernaderos o fitoldos. Organización de las Naciones Unidas para La Alimentación y Agricultura. p. 7-8
30. Farías, C., 1997. Propagación vegetativa. pp. 5. Revisado el 06 de Junio de 2015. Disponible en:
http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/157/htm/sec_4.htm
31. Fernández-Martínez, A. and Charlet, L., 2009. Selenium environmental cycling and bioavailability: a structural chemist point of view. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 8, 81-110. Floor, G.H., Roman-Ross, G., 2012. Selenium in volcanic environments: a review. *Appl. Geochem.* 27, 517–531.
32. Flora of China Editorial Committee, 1998. Flora of China (Scrophulariaceae through Gesneriaceae). 18: 1-49. In C. Y. Wu, P. H. Raven & D. Y. Hong (eds.) *Fl. China*. Science Press & Missouri Botanical Garden Press, Beijing & St. Louis.
33. Floor, G.H. and Roman-Ross, G., 2012. Selenium in volcanic environments: a review. *Appl. Geochem.* 27, 517-531.
34. Fordyce, F.M., 2013. Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: Selenius, O. (Ed.), *Essentials of Medical Geology*. Springer, pp. 375-416.
35. Fulekar, M., Singh, A. and Bhaduri, A.M., 2009. Genetic engineering strategies for enhancing phytoremediation of heavy metals. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 529-535.

36. Gao, S., Tanji, K.K., Dahlgren, R.A., Ryu, J., Herbel, M.J. and Higashi, R.M., 2007. Chemical status of selenium in evaporation basins for disposal of agricultural drainage. *Chemosphere* 69, 585-594.

37. Gettys L., Haller W. and Marc Bellaud, 2014. *Biology and control of aquatic plants*. 2 p.

38. Ghosh, M. and Singh, S.P., 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 3, 1-18.

39. Goh, K.H. and Lim, T.T., 2004. Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: effect of reaction time, pH, and competitive anions on arsenic and selenium adsorption. *Chemosphere* 55, 849-859.

40. Greipsson, S., 2011. Phytoremediation. *Nat. Educ. Knowl.* 2, 7.

41. Gupta M., Tripathi R.D., Rai U.N. and Chandra P., 1998. Role of glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (l.f.) Royle and *Vallisneria spiralis* L. under mercury stress, *Chemosphere* 37, 785-800.

42. Gupta, U. C. and Gupta, S. C., 2000. Selenium in soils and crops, its deficiencies in livestock and humans: implications for management. *Communications in soil science and plant analysis*. Vol. 31, Issue 11-14, p. 1791-1807.

43. Gustavson, K.E., Sonsthagen, S.A., Crunkilton, R.A. and Harkin J.M., 2000. Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analysis. *Environm Toxicol.* 15: 421-430.

44. Harguinteguy, C., Pignata, L. and Fernández A., 2015. Nickel, lead and zinc accumulation and performance in relation to their use in phytoremediation of macrophytes *Myriophyllum aquaticum* and *Egeria densa*. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), CONICET and UNC, Argentina. Ecological Engineering 82, 512-516
45. Hartikainen, H., 2005. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. J. Trace Elem. Med. Biol. 18, 309-318.
46. Hill, N.A., Simpson, S.L. and Johnston, E.L., 2013. Beyond the bed: effects of metal contamination on recruitment to bedded sediments and overlying substrata. Environ. Pollut. 173, 182-191.
47. Hu, B., Cui, R., Li, J., Wei, H., Zhao, J., Bai, F., Song, W. and Ding, X., 2013. Occurrence and distribution of heavy metals in surface sediments of the Changhua River Estuary and adjacent shelf (Hainan Island). Mar. Pollut. Bull. 76, 400-405.
48. Hussain, K., Abdussalam, AK., Rathees, C. and Nabeesa S., 2010. Bioaccumulation of heavy metals in *Bacopa monnieri* L. Pennell growing under different habitat. Int. J. Ecol. & Develop. 15, 66-73.
49. Hussain, K., Abdussalam, AK., Rathees, C. and Nabeesa S., 2011. Heavy metal accumulation potential and medicinal property of *Bacopa monnieri*- a paradox. Dept. of Botany, Unity Women's College, Manjeri. Malppuram. Kerala-676122, India. 1-12 p.
50. INTI-Química, 2005. Requerimientos sobre validación de métodos en el marco de la acreditación de laboratorios según la norma ISO 17025: 2005.

51. Jabeen, R., Ahmad, A. and Iqbal, M., 2009. Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. *Bot. Rev.* 75, 339–364.
52. Jackson, J., Rasmuseen, J.B. and Kalff, J., 1994. A mass balance analysis of trace metals in two weedbeds. *Water Air Soil Pollut.* 75:107-119.
53. Jawaharlal Nehru University, 2000. Potential for environmental impacts from selenium in petroleum refinery wastewater. Technical Report to the National Environmental Protection Authority of India, JNU, School of Environmental Sciences, New Delhi, India.
54. Kalve, S., Sarangi, B.K., Pandey, R.A. and Chakrabarti, T., 2011. Arsenic and chromium hyperaccumulation by an ecotype of *Pteris vittata*-prospective for phytoextraction from contaminated water and soil. *Curr. Sci.* 100, 888-894.
55. Kanabkaew, T. and Puetpaiboon U., 2004. Aquatic plants for domestic wastewater treatment: *Lotus (Nelumbo nucifera)* and *Hydrilla (Hydrilla verticillata)* systems, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(5):749-756.
56. Klapac, T., Mandic, M.L., Grgic, J., Primorac, L., Perl, A. and Krstanovic, V., 2004. Selenium in selected foods grown or purchased in eastern Croatia. *Food Chem.* 85, 445-452.
57. Karami, A. and Shamsuddin, Z.H., 2010. Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 3689–3698.
58. Kawahigashi, H., 2009. Transgenic plants for phytoremediation of herbicides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 225-230.

59. Khan, S., Hesham, A.E.-L., Qiao, M., Rehman, S. and He, J.-Z., 2010. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 288-296.
60. Knipling, E. B., S. H. West, and W. T. Haller, 1970. Growth characteristics, yield potential and nutritive content of water- hyacinths. *Proc. Soil and Crop Sci. Soc. of Fla.* 30:51-63.
61. Kopsell, D. A. and Kopsell, D. E., 2007. *Selenium. In BARKER, A. W., PILBEAM, D. J. Handbook of plant nutrition. CRC Press. p. 515-549.*
62. Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 6–15.
63. Lauchli A., 1993. Selenium in plants: uptake, functions, and environmental toxicity. *Bot;* 106: 455–468.
64. LeDuc, D.L. and Terry, N., 2005. Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 514–520.
65. Lemly AD, 1997. Environmental implications of excessive selenium: a review. *Biomed. Environ. Sci.* 10:415–35.
66. Lemly, A.D., 2004. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 44-56.
67. Lemly, A.D., 2014. Teratogenic effects and monetary cost of selenium poisoning of fish in Lake Sutton, North Carolina. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 160–167.

68. Li, H.F. *et al.*, 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol.* 178, 92-102
69. Lin, Z.Q., Cervinka, V., Pickering, I.J., Zayed, A. and Terry, N., 2002. Managing selenium contaminated agricultural drainage water by the integrated on-farm drainage management system: role of selenium volatilization. *Water Res.* 36, 3150–3160.
70. Lone, M.I., He, Z., Stoffella, P.J. and Yang, X., 2008. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives. *J. Zhejiang Univ.-Sci. B.* 9, 210–220.
71. Manousaki, E. and Kalogerakis, N., 2011. Halophytes present new opportunities in phytoremediation of heavy metals and saline soils. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 656–660.
72. McDonald, L.E., and Strosher, M.M., 1998. Selenium mobilization from surface coal mining in the Elk River basin, British Columbia: a survey of water, sediment and biota. Ministry of Environment, Lands and Parks. Cranbrook, British Columbia. 56 p.
73. Mechora, S., Stibilj, V. and Germ, M., 2013. The uptake and distribution of selenium in three aquatic plants grown in Se (IV) solution. *Aquatic Toxicology* 128-129, 53-59
74. Mechora, S., Germ, M. and Stibilj, V., 2014. Monitoring of selenium in macrophytes. The case of Slovenia. Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarveja 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia. pp. 464-470
75. Mengel, K. and Kirkby, E.A., 1987. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute. p. 687. Bern: Int. Potash Inst.
76. Mesjasz-Przybyłowicz, J., Nakonieczny, M., Migula, P., Augustyniak, M., Tarnawska, M., Reimold, W.U., Koeberl, C., Przybyłowicz, W. and Glowacka, E., 2004. Uptake

- of cadmium, lead, nickel and zinc from soil and water solutions by the nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *Acta Biol. Cracov. Bot.* 46, 75-85.
77. Milic, D., Lukovic, J., Ninkov, J., Zeremski-Skoric, T., Zoric, L., Vasin, J. and Milic, S., 2012. Heavy metal content in halophytic plants from inland and maritime saline areas. *Cent. Eur. J. Biol.* 7, 307–317.
78. Mishra, S., Srivastava, S., Tripathia, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V. and Prasad, M.N.V., 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Ecotoxicology and Bioremediation Group, National Botanical Research Institute, Rana Pratap Marg, Lucknow 226 001, UP, India 1-13 pp.
79. Modaihsh, A., Al-Swailem, M. and Mahjoub, M., 2004. Heavy metal contents of commercial inorganic fertilizer used in the Kingdom of Saudi Arabia. *Agri. Mar. Sci.* 9, 21-25.
80. Molnárova, M. and Farasová, 2009. Se (IV) phytotoxicity for monocotyledonae cereals (*Hordeum vulgare* L., *Triticum aestivum* L.) and dicotyledonae crops (*Sinapis alba* L., *Brassica napus* L.) Department of Ecosozology and Physiotactics, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina B2, SK-842 15 Bratislava, Slovak Republic. *Journal of Hazardous Materials* 172, 854-861.
81. Moscow Lomonosov State University, 2001. Trace element pollution from coal combustion in the Gorkiy Reach of Volga. Technical Report to the Russian Academy of Sciences, MLSU, Department of Biology, Moscow, Russia.
82. Mukhopadhyay, S. and Maiti, S.K., 2010. Phytoremediation of metal enriched mine waste: a review. *Global J. Environ. Res.* 4, 135-150.

83. Munoz-Olivas, R. and Camara, C., 2001. Speciation related to human health. In: Ebdon, L., Pitts, L., Cornelis, R., Crews, H., Donard, O.F.X., Quevauviller, P. (Eds.), Trace Element Speciation for Environment. Food and Health. The Royal Society of Chemistry, pp. 331-353.
84. Naees, M., Ali, Q., Shahbaz, M. and Ali, F., 2011. Role of rhizobacteria in phytoremediation of heavy metals: an overview. *Int. Res. J. Plant Sci.* 2, 220-232.
85. Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A. and Vianello, A., 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1527-1536
86. Nátr, L., 2002. Fotosyntetická produkce a výživa lidstva. ISV nakladatelství. 423 s.
87. Navarro-Alarcon, M. and Cabrera-Vique, C., 2008. Selenium in food and the human body: a review. *Sci. Total Environ.* 400, 115-141.
88. Navarro-Aviñó, J. P., Aguilar-Alonso, L, López-Moya, J. R., 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas.* 16: 10-25.
89. New South Wales Environment Protection Authority, 1999. Selenium pollution associated with estuarine disposal of coal combustion wastes. Technical Report IQ-1854, NSW EPA, Bankstown, Australia.
90. Nyberg, S., 1991. Multiple use of plants: studies on selenium incorporation in some agricultural species for the production of organic selenium compounds. *Plant Foods Human Nutr.* 41:69-88
91. Odjegba, V.J. and Fasidi, I.O., 2007. Phytoremediation of heavy metals by *Eichhornia crassipes*. *Environmentalist* 27, 349-355.

92. Ohlendorf, H.M., 2002. The birds of Kesterson Reservoir: a historical perspective. *Aquat. Toxicol.* 57, 1–10.
93. Ornes, W.H., Sajwan, K.S., Dosskey, M.G. and Adriano D.C, 2011. Bioaccumulation of selenium by floating aquatic plants. **Article** in *Water Air and Soil Pollution* 57-58(1):53-57
94. Outridge, P.M. and Noller, B.N., 1991. Accumulation of toxic trace elements by freshwater vascular plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 121:2-63.
95. Padmavathiamma, P.K. and Li, L.Y., 2007. Phytoremediation technology: hyperaccumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollut.* 184, 105–126.
96. Pilon-Smits, E.A.H. and Quinn, C.F, 2010. Selenium metabolism in plants. In *Cell Biology of Metals and Nutrients*; Hell, R., Mendel, R.-R., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, Volume 17, 225-241.
97. Pedrero, Z., Madrid, Y. and Cámara, C., 2006. Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2412-2417.
98. Peng, A., Xu, Y., Liu, J.H. and Wang, Z.J., 2000. Study on the dose-effect relationship of selenite with the growth of wheat, *Biol. Trace Elem. Res.* 76, 175–181.
99. Piccolo, A., Nardi, S. and Concheri, G., 1992. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biol. Biochem.* 24, 373–380.

100. Pramod, M., Arjun B. and Pandurang A., 2011. Biosorption and Biochemical Study on Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) With Reference to Selenium. School Of Earth Sciences, Swami Ramanand Teerth Marathwada University, Nanded, MH.india. Archives of Applied Science Research, 3 (1): 222-229
101. Prasad, M.N.V., 2004. Phytoremediation of metals in the environment for sustainable development. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. Part B 70, 71-98.
102. Rafati, M., Khorasani, N., Moattar, F., Shirvany, A., Moraghebi, F. and Hosseinzadeh, S., 2011. Phytoremediation potential of *Populus alba* and *Morus alba* for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil. Int. J. Environ. Res. 5, 961-970.
- Roberts, D.A., 2012. Causes and ecological effects of resuspended contaminated sediments (RCS) in marine environments. Environ. Int. 40, 230-243.
103. Rai U.N., Tripathi R.D., Gupta, M. and Chandra P., 1995. Induction of phytochelatin under cadmium stress in water lettuce (*Pistia stratiotes* L.), J. Environ. Sci. Health A. 30, 2007–2026.
104. Ramamurthy, A.S. and Memarian, R., 2012. Phytoremediation of mixed soil contaminants. Water Air Soil Pollut. 223, 511-518.
105. Ravindran, K.C., Venkatesan, K., Balakrishnan, V., Chellappan, K.P. and Balasubramanian, T., 2007. Restoration of saline land by halophytes for Indian soils. Soil Biol. Biochem. 39, 2661-2664.
106. Ruiz, F., Abad, M., Bodergat, A.M., Carbonel, P., Rodríguez-Lázaro, J. and Yasuhara, M., 2005. Marine and brackish-water ostracods as sentinels of anthropogenic impacts. Earth-Sci. Rev. 72, 89-111.

107. Sabiha-Javied, Mehmood, T., Tufai, M. and Irfan, N., 2009. Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan. *Microchem. J.* 91, 94-99.
108. Saier, M.H. and Trevors, J.T., 2010. Phytoremediation. *Water Air Soil Pollut.* 205, 61–63.
109. Sakai, Y., Ma, Y., Xu, C., Wu, H., Zhu, W. and Yang, J., 2012. Phytodesalination of a saltaffected soil with four halophytes in China. *J. Arid Land Stud.* 22, 17-20.
110. Sakakibara, M., Ohmori, Y., Ha, N.T.H., Sano, S. and Sera, K., 2011. Phytoremediation of heavy metal contaminated water and sediment by *Eleocharis acicularis*. *Clean: Soil, Air, Water* 39, 735–741.
111. Sappington, K.G., 2002. Development of aquatic life criteria for selenium: a regulatory perspective on critical issues and research needs. *Aquat. Toxicol.* 57, 101–113. Slovenian Regulations.
112. Sarma, H., 2011. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *J. Environ. Sci. Technol.* 4, 118–138.
113. Sasmaz, M., Isil, E., Topal, A. and Sasmaz, A., 2015. The potential of *Lemna gibba* L. and *Lemna minor* L. to remove Cu, Pb, Zn, and As in gallery water in a mining area in Keban, Turkey. *Journal of Environmental Management* 163, 246-253.
114. Schnitzer, M. and Rauthan, B.S., 1981. Effects of soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Cucumis sativus*) plantas. *Plant soil*, 63, 491-495.

115. Seby, F., Potin-Gautier, M., Giffaut, E., Borge, G. and Donard, O.F.X., 2001. A critical review of thermodynamic data for selenium species at 25 degrees C. *Chem. Geol.* 171, 173–194.
116. Sekara, A., Poniedzialek, M., Ciura, J. and Jedrszczyk, E., 2005. Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: implications for phytoremediation. *Pol. J. Environ. Stud.* 14, 509-516.
117. SENAMHI, 2015. Datos históricos climatológicos. Revisado el 06 de Junio de 2015. Disponible en:
http://www.senamhi.gob.pe/include_mapas/dat_esta_tipo.php?estaciones=000837
118. Shabani, N. and Sayadi, M.H., 2012. Evaluation of heavy metals accumulation by two emergent macrophytes from the polluted soil: an experimental study. *Environmentalist* 32, 91–98.
119. Sigrist, M., Brusa, L., Campagnoli, D. and Beldomenico, H., 2012. Determination of selenium in selected food samples from Argentina and estimation of their contribution to the Se dietary intake. *Food Chem.* 134, 1932-1937.
120. Simpson, S.L. and Batley, G.E., 2007. Predicting metal toxicity in sediments: a critique of current approaches. *Integrated Environ. Assess. Manage.* 3, 18–31.
121. Singh, A. and Prasad, S.M., 2011. Reduction of heavy metal load in food chain: technology assessment. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10, 199–214.
122. Singh, S., 2012. Phytoremediation: a sustainable alternative for environmental challenges. *Int. J. Gr. Herb. Chem.* 1, 133–139.

123. Sinha S., 1999. Accumulation of Cu, Cd, Cr, Mn and Pb from artificially contaminated soil by *Bacopa monnieri*, *Environ. Monit. Assess.* 57, 253–264.
124. Sors, T. G., Ellis, D. R. and Salt, D. E. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis research.* 2005, Vol. 86, Issue 3, p. 373-389.
125. Stadtman T.C., 1996. Selenocysteine. *Annu Rev Biochem.* 65:83-100.
126. St-Cyr. L., Campbell, P.G. and Guerin, K., 1994. Evaluation of the role of submerged plant beds in the metal budget of a fluvial lake. *Hydrobiologia*, 291: 141-156.
127. Suresh, B. and Ravishankar, G.A., 2004. Phytoremediation-A novel and promising approach for environmental clean-up. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24, 97-124.
128. Sutcliffe, J.F., 1962. Mineral salts absorption in plants. Pergamon Press, London, England.
129. Technigro, 2012. Your alert to new and emerging threats. Hairy water hyssop (*Bacopa lanigera*). 1-2 p.
130. Terry, N., Zayed, A. M., de Souza, M. P. and Tarun, A. S., 2000. Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 401-432.
131. Torres, J., Pintos, V., Gonzatto, L., Dominguez, S., Kerner, C. and Kremer, E., 2011. Selenium chemical speciation in natural waters: protonation and complexation behavior of selenite and selenate in the presence of environmentally relevant cations. *Chem. Geol.* 288, 32-38.

132. Trelease SF. and Beath OA. 1949. Selenium, Its Geological Occurrence and Its Biological Effects in Relation to Botany, Chemistry, Agriculture, Nutrition, and Medicine, p. 292. New York: Trelease & Beath.
133. Tripathi R., Rai U.N., Gupta M. and Chandra P., 1996. Induction of phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (l.f.) Royle under cadmium stress, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 505-512.
134. Turan, M. and Esringu, A., 2007. Phytoremediation based on canola (*Brassica napus* L.) and Indian mustard (*Brassica juncea* L.) planted on spiked soil by aliquot amount of Cd, Cu, Pb, and Zn. *Plant Soil Environ.* 53, 7-15.
135. Tveitnes, S., Singh, B.R. and Ruud, L., 1996. Selenium concentration in spring wheat as influenced by basal application and top dressing of selenium-enriched fertilizers. *Fert. Res.* 45, 163–167.
136. USEPA, 2014. External Peer Review Draft Aquatic Life Ambient Water Quality Criterion for Selenium - Freshwater. 1-4 pp
137. USEPA 1987. Ambient water quality criteria for selenium, 1987. Office of Water, Washington, DC.
138. Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., Van der Lelie, D. and Mench, M., 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 765–794.
139. Vardanyan, L. G., and Ingole, B. S., 2006. Studies on heavy metal accumulation in aquatic macrophytes from Sevan (Armenia) and Carambolim (India) lake systems. *Environment international*, 32, 208–218.

140. Vaughan D, Malcolm R. and Ord B., 1976. Influence of humic substances on biochemical processes in plants. In: D
141. Vaughan D. and Ord B., 1981. Uptake and incorporation of ^{14}C -labelled soil organic matter by roots of *Pisum sativum* L. *J Exp Bot* 1981; 32: 679-687.
142. Veneros R., Castillo, E., Chaman M. y Ramírez, F., 2014. Efecto de ácido húmico y fúlvico en el crecimiento de *Passiflora ligularis* cultivada en condiciones de invernadero. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Perú. p. 1-5
143. Ventura, M.G., Stibilj, V., Freitas, M.D. and Pacheco, A.M.G., 2009. Determination of ultratrace levels of selenium in fruit and vegetable samples grown and consumed in Portugal. *Food Chem.* 115, 200-206.
144. Vithanage, M., Dabrowska, B.B., Mukherjee, B., Sandhi, A. and Bhattacharya, P., 2012. Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. *Environ. Chem. Lett.* 10, 217–224.
145. Vishnoi, S.R., Srivastava, P.N., 2008. Phytoremediation-green for environmental clean. In: *The 12th World Lake Conference*, pp. 1016-1021.
146. Wang, H., Wang, J., Liu, R., Yu, W. and Shen, Z., 2015. Spatial variation, environmental risk and biological hazard assessment of heavy metals in surface sediments of the Yangtze River estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 93, 250–258.
147. Wang, W.X. and Rainbow, P.S., 2008. Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals. *Comp. Biochem. Phys. C* 148, 315–323.

148. Wang, W.-X. and Rainbow, P.S., 2008. Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals. *Comp. Biochem. Phys. C* 148, 315–323.
149. Wilson, J.R., Holst, N. and Rees, M. (2005) Determinants and Patterns of Population Growth in Water Hyacinth. *Aquatic Botany*, 81, 51-67.
150. Wuana, R.A. and Okieimen, F.E., 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology* 2011, 1–20.
151. Xu, Y., Sun, Q., Yi, L., Yin, X., Wang, A., Li, Y. and Chen, J., 2014. The source of natural and anthropogenic heavy metals in the sediments of the Minjiang River Estuary (SE China): implications for historical pollution. *Sci. Total Environ.* 493, 729–736.
152. Yadav, R., Arora, P., Kumar, S. and Chaudhury, A., 2010. Perspectives for genetic engineering of poplars for enhanced phytoremediation abilities. *Ecotoxicology* 19, 1574–1588.
153. Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q. and Ma, L.Q., 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci. Total Environ.* 368, 456-464.
154. Zhang, J. and Liu, C.L., 2002. Riverine composition and estuarine geochemistry of particulate metals in China-weathering features, anthropogenic impact and chemical fluxes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 54, 1051–1070.
155. Zhang, X. and Ervin, E.H., 2004. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bent grass leaf cytokinins and drought resistance. *Crop Sci.* 44, 1737–1745

156. Zayed, A., Lytle, C. M. and Terry, N., 1998. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta*. Vol. 206, Issue 2, p. 284-292
157. Zorrig, W., Rabhi, M., Ferchichi, S., Smaoui, A., Abdelly, C., 2012. Phytodesalination: a solution for salt-affected soils in arid and semi-arid regions. *J. Arid Land Stud.* 22, 299–302.

