

Tolerancia de *Lemna gibba* a metales pesados bajo condiciones de estrés nutricional

Tolerance of *Lemna gibba* to heavy metals under nutritional stress conditions

Esneider Rojas Vargas¹ y Laura Natalí Afanador Barajas²

Resumen

El incremento poblacional, junto con la minería y las actividades agrícolas, han provocado cambios en el medioambiente. En particular, han modificado la composición de aguas y suelos en la última década. Las investigaciones realizadas en los últimos años sobre el género *Lemna* han reportado su capacidad como agente biorremediador en aguas con metales pesados. En este estudio, se evaluó la tolerancia a plomo que presenta *Lemna gibba* en condiciones de laboratorio. Para esto, se sumergieron doce grupos de hojas de *L. gibba* —extraídas del Humedal La Conejera— durante diez días en agua destilada. Luego, las muestras fueron llevadas al laboratorio y puestas en vasos de precipitado con diferentes concentraciones de nitrato de plomo. Allí fueron pesadas durante cinco días para analizar los cambios por la presencia de plomo en agua. Finalmente, se midió la cantidad de este metal en hojas mediante la técnica de absorción atómica. Los resultados obtenidos indicaron que *L. gibba* presenta un grado de tolerancia significativo frente al plomo, a pesar de que la planta estuvo expuesta a condiciones de estrés

nutricional durante un periodo aproximado de seis días, donde el mayor porcentaje de remoción fue del 52%. Para este estudio se concluyó que *L. gibba* presenta una respuesta fisiológica favorable frente a la ausencia de minerales importantes para su desarrollo.

Palabras clave: *Lemna Gibba*, Biorremediación, Metales Pesados, Bioensayo, Absorción Atómica, Plomo.

Abstract

Population growth, together with mining and agricultural activities, have generated changes in the environment. Particularly, there have modified the composition of water and soil in the past decade. In recent investigations realized in the last years about the genus *Lemna* have been reported its capacity as agent biorremediador in wa-

¹ Estudiante de Biología, Universidad Central.
Correo: erojasv@ucentral.edu.co.

² Bióloga, microbióloga y M. Sc. en Ciencias Biológicas. Docente de tiempo completo de la Universidad Central e integrante del Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Nuevos Materiales (BioMat).
Correo: lafanadorb@ucentral.edu.co

ters with heavy metals. This study evaluated the tolerance to lead by *Lemna gibba* in laboratory conditions. For this, we adapted 12 groups of leaves of *L. gibba* -extracted from wetland La Conejera- during 10 days in distilled water. Then, the samples were taken to laboratory and they were put into beakers with different concentrations of lead nitrate. The samples were weighed for five days to analyze the changes by the presence of lead in water. Finally, we measured the amount of this metal in leaves by atomic absorption technique. The re-

sults indicated that *L. gibba* has a significant degree of tolerance when the plant is exposed to conditions of nutritional stress during a period of approximately six days, where the greater percentage of removal was 52%. For this study, we concluded that *L. gibba* presents a favorable physiological response to the absence of important minerals for their development.

Keywords: *Lemna Gibba*,
Bioremediation, Heavy Metals,
Bioassay, Atomic Absorption, Aead.

1. Introducción

Los procesos de industrialización usan, cada vez más, metales pesados en áreas rurales y urbanas. Esta situación obliga a buscar maneras de erradicar los problemas que los metales provocan. Estos están presentes de manera natural y, por ende, pueden llegar a ser perjudiciales para animales y plantas, dependiendo del sustrato en que se encuentren y la concentración (Nicholson et ál., 2003). La presencia imperceptible de estos agentes contaminantes lleva al desarrollo de células malignas en el cuerpo, que dan paso a la formación de tumores cancerígenos (Mejía Domínguez, 2011). Según Prüss-Ustün y Corvalan (2006), los metales pesados pueden afectar la composición de la sangre, vías respiratorias, riñones, hígado y dañar el sistema nervioso central, hecho que causa el Alzheimer. Por lo anterior, la biorremediación es una alternativa para eliminar contaminantes sobre aguas o suelos por medio de organismos vivos que se encargan de bioacumularlos (Ferrera Serrato et ál., 2006). De la misma manera, la fitorremedia-

ción es una técnica usada para remover contaminantes de diferentes sustratos a partir de plantas vasculares. Lo anterior se fundamenta en el reconocimiento de tejidos que acumulan toxinas y metales pesados (Martelo y Lara, 2012). Distintas ramas de investigación en química y biología se han dedicado a estudiar géneros de plantas capaces de biorremediar ambientes en los que existe un desbalance o un exceso de componentes perjudiciales para el desarrollo biológico de las especies (Agudelo et ál., 2005).

Todas las plantas vasculares pueden acumular metales que van a llegar a los frutos, hojas o semillas y que, a través de estas, afectan a herbívoros y seres humanos. A esto se suma que existen grupos con una mayor capacidad de tolerar concentraciones de mercurio, plomo, arsénico, hierro, cobre y aluminio (Gupta et ál., 2013); tanto así que algunos géneros de plantas acuáticas y terrestres son utilizados para remover metales. Esta es una manera económicamente factible y eficaz de descontaminar zonas con estas características (De Miguel et ál., 2014).

Este es el caso del género *Lemna*, que se encuentra en algunos cuerpos de agua artificiales del humedal La Conejera y, al igual que la mayoría de las macrófitas, es bioindicador de aguas eutrofizadas, por su sensibilidad a cambios de pH y temperatura (Nabila y Mostefa, 2013). *L. gibba* es una planta flotante que presenta fusión de hojas y tallo con una longitud promedio de 5 a 15 mm de radio y raíces entre 1 y 3 cm de largo. El tejido vegetal está formado por un parénquima fotosintético en la cara superior y uno aerífero en la parte inferior (Arenas et ál., 2011). La mayoría de plantas flotantes habitan aguas con un alto contenido de materia orgánica, principalmente fósforo y nitrógeno (García y Fernández, 2009).

La llegada de *Lemna* a un determinado medio acuático se produce a través de un agente dispersor accidental como el hombre, de la introducción de un flujo de agua que contenga esta especie o de las aves como vectores de dispersión (Beascochea, 2001). Una vez en el medio, su mecanismo de propagación es vegetativo, mediante la producción de un fronde hijo a partir de un fronde madre.

El proceso de bioacumulación de metales por parte de *Lemna* y otros géneros está mediado por la rizofiltración, donde los metales y contaminantes pasan a las membranas celulares de la raíz y son transportados por el xilema hasta el tejido aerífero de la planta (Bhupinder, 2013). De esta manera, el manejo de los sistemas de tratamiento acuático usados en biorremediación se basan en mantener una cubierta de lentejas de agua sobre la superficie del cuerpo de agua (Martelo y Lara, 2012).

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de tolerancia a plomo de *L. gibba* sobre aguas no eutrofizadas, con el fin de conocer el comportamiento de esta especie bajo condiciones de estrés nutricional en laboratorio, con lo cual se puede aportar de mane-

ra significativa a los estudios de remoción de metales pesados en ambientes acuáticos por parte de plantas vasculares nativas.

2. Metodología

2.1 Selección de material vegetal

El humedal La Conejera, ubicado al noroccidente de la ciudad de Bogotá, en la localidad de Suba, fue el lugar donde se realizó el muestreo del material vegetal. Allí se registran poblaciones numerosas de *L. gibba*. El muestreo se realizó en un estanque ubicado a ochenta metros de la entrada a la reserva del humedal por toma directa. Las muestras fueron guardadas en frascos de vidrio con agua del medio donde flotaban los individuos para luego ser llevados a aclimatación en laboratorio.

2.2 Cultivo de *L. gibba*

Se usaron grupos de veinte a treinta individuos a doce recipientes con agua para eliminar residuos adheridos a las raíces que interfirieran con el análisis. Luego, fueron llevados al Laboratorio de Sistemas Naturales de la Universidad Central. Allí se midió el peso fresco y, posteriormente, se sometieron a una solución de agua destilada y nitrato de plomo en cuatro concentraciones.

Se hizo un diseño de experimentos a cuatro bloques con tres replicas cada uno, los cuales correspondían a las concentraciones de 4 ppm, 8 ppm, 14 ppm, y 32 ppm de nitrato de plomo para tener un total de doce muestras y un grupo control. Todas las muestras fueron puestas en agua destilada para este bioensayo. Lo anterior se llevó a cabo en un periodo de cinco días con un pH inicial de 7.0 y una temperatura promedio de 18°C.

Se preparó una solución patrón de Plomo de 100 mg/l y unas soluciones de trabajo

para establecer, a diferentes concentraciones, los efectos sobre *L. gibba*. Las concentraciones que se utilizaron para el bioensayo fueron de 4.0, 8.0, 14 y 32 ppm de Pb establecidas como concentraciones mínimas para evaluar el efecto de plomo sobre *L. gibba* en condiciones oligotróficas. Las concentraciones fueron preparadas en balones aforados de 100 mL a partir de la solución patrón. Dentro del estudio, se manejó un control negativo que contenía únicamente agua destilada.

2.3 Aumento de peso diario y estudios de acumulación

Para determinar el aumento del peso diario en *L. gibba* fueron seleccionadas aleatoriamente hojas de cada dosis de plomo; estas fueron pesadas en una báscula analítica desde el día uno hasta el cinco. Se tomaron siempre los mismos individuos para ver los cambios durante el proceso de acumulación, teniendo en cuenta la misma hora y periodicidad.

Para los estudios de acumulación, se usaron cuatro concentraciones de plomo contempladas en el numeral dos. Las plantas fueron lavadas con agua destilada, secadas con papel absorbente y llevadas al horno por 24 horas a 65 °C. Posteriormente fueron pesadas y calcinadas a 550 °C durante 9 horas. La digestión de la planta se hizo con 13 mL de una mezcla de HCl, HNO₃ y H₂O (ácido clorhídrico, ácido nítrico y agua, respectivamente). Luego, el contenido de cada concentración fue diluido en agua destilada a un volumen de 10 mL para ser llevado a un espectrofotómetro de absorción atómica marca *Varian*, referencia 240 FS.

2.4 Análisis histológico

Con el fin de analizar la acumulación de plomo dentro de los tejidos vegetales, se llevaron a cabo cortes histológicos de las hojas de *L. gibba*, el primer día del experimento, antes

de exponer las plantas a plomo, y después de la fase experimental (aproximadamente una semana), con el fin de comparar los cambios estructurales dentro del parénquima aerífero.

2.5 Análisis de datos

La biomasa fue determinada al final del experimento y se usó el cálculo de porcentaje de eficiencia de remoción de plomo de acuerdo a Tanhan et ál. (2007).

$$\% \text{ eficiencia} = (C_0 - C_1 / C_0) * 100$$

Donde C₀ y C₁ son concentración inicial y restante con respecto al medio (mg L⁻¹). Para los análisis estadísticos, se usó el software Statgraphics Centurion XVII. Inicialmente, se realizó un test de normalidad (Shapiro-wilk) y un test de Anova (Analysis of Variance) a una y dos vías. Con estos se evaluó, por un lado, el peso como variable dependiente y, por otro, los tratamientos y los días del bioensayo como factores.

3. Resultados

Los resultados obtenidos para el estudio de acumulación de plomo en laboratorio en las hojas de *L. gibba* demuestran su capacidad de tolerancia a metales pesados bajo condiciones de estrés nutricional. La figura 1 muestra una relación entre el aumento de peso y el tiempo hasta el día tres. En la concentración de 8 ppm, se observa un aumento de peso comparado con los otros bioensayos.

Es importante tener en cuenta que las hojas de *L. gibba* pesaron más en el tercer día para todas las concentraciones trabajadas. Lo anterior se contrasta con la información de la figura 2, donde puede observarse el tratamiento en el que *L. gibba* acumuló más plomo (8 ppm) y en el que menos lo hizo durante los cinco días de experimentación (4 ppm).

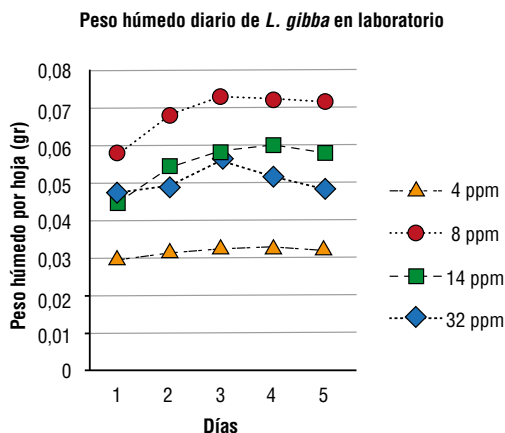


Figura 1. Peso húmedo diario de *L. gibba* puestas en agua destilada y plomo por cinco días.
Fuente: elaboración propia.

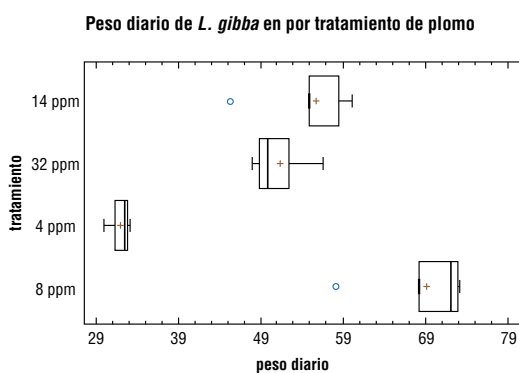


Figura 2. Diferencias estadísticas en el peso de *L. gibba* durante el bioensayo en laboratorio sobre diferentes concentraciones de plomo.
Fuente: elaboración propia.

Los análisis de varianza mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el peso diario y los tratamientos, por medio de la prueba de Tukey. Las diferencias en peso reportadas en las plantas sometidas a las diferentes concentraciones se deben principalmente a los tratamientos de 14 y 32 ppm. Por otro lado, en relación con el factor del tiempo, se observa que, en el segundo día, hay diferencias con los demás ($P = 0,0032$), ya que es donde más se observa el aumento de peso. Para el día tres, sigue viéndose un aumento, pero en menor proporción. En este sentido, se puede sugerir que la eficiencia de re-

moción es más rápida en el segundo día, estando bajo condiciones de estrés nutricional.

Se encontraron las trazas de plomo contenidas en el tejido aerífero de *L. gibba* por medio de espectrofotometría de absorción atómica. En la figura 3 se muestra la cantidad acumulada en miligramos de plomo por kilogramo seco de *L. gibba*. El estudio de acumulación se hizo por triplicado con cuatro concentraciones, las cuales presentan una desviación similar entre sí con respecto a la media.

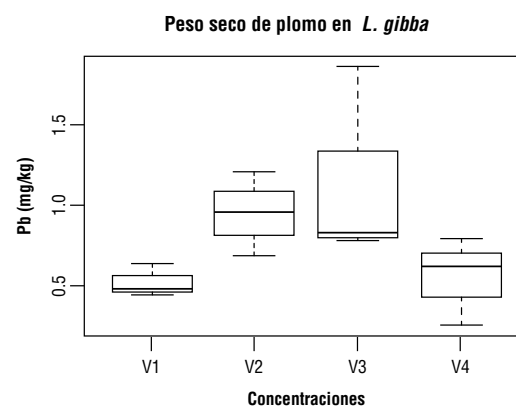


Figura 3. Bioacumulación de plomo en hojas de *L. gibba* sobre agua destilada.
Fuente: elaboración propia.

Según la prueba de bondad de ajuste de *Shapiro Wilk*, la acumulación de plomo en mg/kg seco de *Lemna gibba* se ajusta a una distribución normal. Por otra parte, el test Anova no muestra diferencias significativas en función de los tratamientos con este metal en agua destilada ($p = 0,1712$, $n = 12$). Por este hecho, se pudo concluir que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de las dosis de plomo en hojas entre un nivel de concentración y otro, con una significancia del 5%. A su vez, se puede inferir que la capacidad de acumulación de plomo en las hojas no depende enteramente de condiciones de estrés nutricional.

En el caso de las dos muestras con menor concentración de plomo en las frondas, dicha concentración puede deberse a los efectos tóxicos que este metal tiene sobre las plantas en general, ya que afecta el metabolismo, inhibiendo la síntesis de clorofila (Bhupinder, 2013). Este análisis sugiere que, sin importar la concentración en cada tratamiento, el plomo acumulado en las hojas es estadísticamente similar al cabo de los cinco días de tratamiento. Esto se contrasta con el límite de saturación de *L. gibba* en todas las concentraciones trabajadas, pues se observó un incremento de peso por fronda hasta el tercer día en los cuatro tratamientos, después del cual el peso disminuyó progresivamente.

La eficiencia de remoción por parte de *L. gibba* en relación con el plomo está medida en porcentajes. En la figura 4, se pueden ver dos concentraciones con un porcentaje de 52% y un 47% (4 mgL^{-1} y 8 mgL^{-1} , respectivamente).

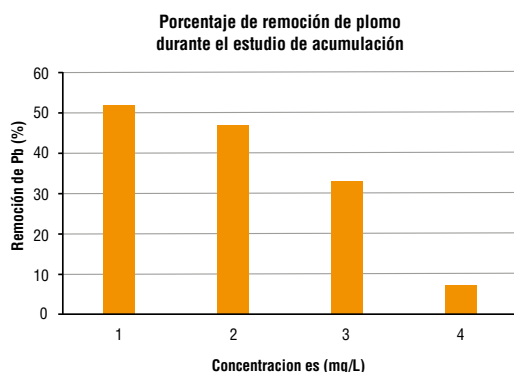


Figura 4. Porcentaje de eficiencia de remoción de *L. gibba* expuesta a diferentes concentraciones de plomo.

Fuente: elaboración propia.

Para este caso, se puede afirmar que, bajo condiciones de estrés nutricional, el promedio de la eficiencia de remoción en *L. gibba* es del 45%, lo que podría suponer que la ausencia de fósforo y nitrógeno en su hábitat normal

no es crucial para remover metales pesados del medio acuático.

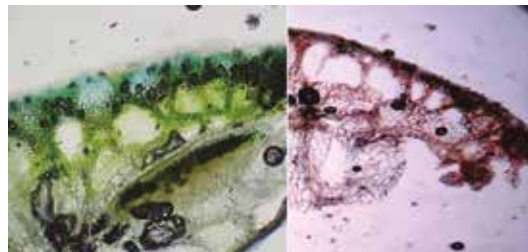


Figura 5. Efecto en los tejidos vegetales por plomo en dos cortes transversales de hoja en *L. gibba* después de 5 días de exposición.

Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, en la figura 5 puede verse un cambio estructural en el parénquima aerífero de *L. gibba*, cuyo resultado demuestra que la rizofiltración de plomo puede generar un cambio en las paredes celulares de las hojas. También es posible observar la presencia de elementos extraños dentro del tejido y una coloración parda anormal. La parte superior en ambos cortes histológicos corresponde a los conductos que transportan agua y nutrientes, vitales para el proceso de fotosíntesis, en los cuales se observan diferencias a nivel morfológico. El xilema y floema (conductos) no se pueden observar con total claridad, adicionalmente los espacios intercelulares se ven reducidos en la imagen de la derecha y el color pardo puede deberse a la falta de cloroplastos, importantes en el proceso de fotosíntesis.

4. Discusión

Los resultados obtenidos en el bioensayo realizado confirman la utilidad de *L. gibba* como planta útil en biorremediación, por su capacidad de fitoacumulación de metales (Leblebici y Aksoy, 2011), teniendo en cuenta las condiciones de estrés nutricional a las que

estuvo expuesta en este experimento. Inicialmente, debe tenerse en cuenta la capacidad de adaptación de esta especie, ya que, a pesar de no haber estado en un ambiente con aguas eutrofizadas, respondió de manera efectiva a la remoción y tolerancia de plomo con la ausencia de nitrógeno y fósforo, elementos importantes en el desarrollo normal de las plantas (Gupta et ál., 2013).

Es importante resaltar que el tiempo de exposición al plomo tolerado por la planta responde positivamente a los objetivos esperados, ya que, a pesar de estar en un sustrato con la ausencia total de macronutrientes y micronutrientes, removió aproximadamente un 50% de plomo. Este resultado contradice parte de los experimentos realizados por Leblebici y Aksoy (2011). Este afirma que el aumento de nutrientes eleva la tolerancia de *L. gibba* a plomo y que la ausencia de nutrientes la disminuye significativamente. A pesar de que se generen cambios en la coloración de las hojas como señal de carencia de bioelementos importantes en el metabolismo, no se detiene ni se disminuye, en gran medida, la acumulación de plomo en frondas o el porcentaje de eficiencia de remoción en este bioensayo.

Debe tenerse en cuenta que la exposición prolongada bajo condiciones oligotróficas de plantas acuáticas puede generar un aumento de clorosis y pérdida progresiva de la población hasta el punto de desaparecer (Madigan y Martinko, 2004). Por otro lado, Miranda y Quiroz (2013) reportaron tolerancia al plomo por el mismo individuo en condiciones normales. Este es un comportamiento muy similar al de los bioensayos realizados en este estudio.

Lo anterior sugiere que, en las aguas eutróficas y oligotróficas, existen otros factores ambientales más allá del hábitat —aún no evaluados— que están involucrados en la actividad de acumulación de plomo en los tejidos

vegetales que todavía no se han evaluado. Una posible explicación a este comportamiento puede deberse a la expresión de MTF-I, un gen que codifica un factor de transcripción que induce a la expresión de unas proteínas especializadas en el aparato de Golgi de las células vegetales y animales. A estas se les denomina *metalotioneínas*, proteínas que tienen la capacidad de unirse a metales pesados fisiológicos o xenobióticos por medio de grupos tiol (Sigel et ál., 2010).

Dentro del estudio de acumulación se evidenció el aumento de peso de *L. gibba* durante los tres primeros días, lo cual se ajusta a los estudios realizados por Miranda y Quiroz (2013). Ellos afirman que *L. gibba* es tolerante al plomo hasta el día tres o cuatro, ya que después las plantas empiezan a liberar el metal al medio. Este fenómeno puede estar relacionado con los transportadores de membrana, que en las raíces flotantes de *L. gibba* son los encargados de llevar los compuestos inorgánicos hasta el tejido aerífero de las frondas. Los transportadores de membrana y su posterior papel están influenciados por factores genéticos y de transcripción (Sigel et ál., 2010). También la acumulación y remoción de metales puede estar influenciada principalmente por factores ambientales: pH del agua, temperatura, salinidad, potencial de oxidorreducción y flujo de agua (Bhupinder, 2013).

Durante el experimento, se observó el cambio de color en los tejidos de *L. gibba* en los cortes histológicos (figura 5), posiblemente por el efecto que el plomo ejerce sobre el crecimiento de las plantas (Gupta et ál., 2013). La clorosis puede ser una explicación a este fenómeno, que ocurre debido a la falta de nutrientes y a las concentraciones de metales pesados en el medio. Según Nabila y Mostefa (2013), la clorosis se da por la inhibición de nutrientes y la presencia de metales pesados

xenobióticos, ya que en el centro de magnesio, en la molécula de clorofila, los enlaces de carbono se rompen y, por consiguiente, la planta va perdiendo la capacidad de fotosíntesis.

En el bioensayo con plomo se evidenció este fenómeno en todas las concentraciones trabajadas, pero con algunas diferencias. Por ejemplo, en la menor concentración (4 ppm), se evidenció un efecto de clorosis mayor, por la cantidad de hojas muertas en la base de los recipientes. Mientras que, en la mayor (32 ppm), se observó que la clorosis no afectó la capacidad de acumulación de las plantas, a pesar de que la cantidad de hojas muertas fue menor.

La explicación a este fenómeno puede estar relacionada con una respuesta fisiológica de *L. gibba* en condiciones de estrés nutricional, pues en sustratos oligotróficos aumenta la asignación de recursos a las raíces. A su vez, estas tienden a disminuir su capacidad de absorción, para ahorrar inversión de proteínas (Larcher, 1995). Este hecho explica el tamaño reducido de las frondas durante el bioensayo. En estos casos, sería de vital importancia adelantar otro tipo de estudios con *L. gibba* a nivel molecular, analizando la expresión de proteínas con el fin de entender todos los procesos implicados en la acumulación y remoción de metales.

La tolerancia de metales pesados xenobióticos por parte de las plantas acuáticas está influenciada por factores abióticos que pueden aumentar o disminuir dichos procesos (Bhupinder, 2013). Los estudios del efecto de pH hechos por Verma y Surindra (2015) explican la importancia de los cambios de pH para la remoción de metales. Los resultados de este estudio se ajustan a los obtenidos en laboratorio. Un pH de entre 6 y 7 es óptimo para el crecimiento de *L. gibba*. Por otro lado, los pH muy bajos pueden ser tóxicos para su crecimiento, ya que el incremento de iones de hidrógeno disminuye el gradiente electroquí-

mico a través de la membrana plasmática y, en consecuencia, afecta directamente la captación de cationes (Zeiger y Taiz, 2006).

Lo anterior se evidencia en el tamaño reducido de las frondas en laboratorio. Los pH reportados en el bioensayo (6,3) son ligeramente ácidos para el desarrollo normal de *Lemna*. Dichas observaciones morfológicas se ajustan a los trabajos realizados por Verma y Surindra (2015), con los que se evaluaron los cambios de pH y el efecto tóxico de estos sobre la remoción de plomo con *L. gibba*.

5. Conclusiones

Se observó que *L. gibba* exhibió una respuesta fisiológica favorable, a pesar de las condiciones adversas a las que se expuso. Por lo tanto, se puede inferir que existe un alto grado de tolerancia al plomo en agua destilada. Por otro lado, es importante tener en cuenta otros parámetros que no se contemplaron en este estudio; por ejemplo, la longitud de las raíces. El tamaño de estas permite inferir que el potencial de remoción de plomo ocurre únicamente en un rango de 10 a 12 cm de profundidad, ya que *L. gibba* es una planta flotante que habita en ambientes lénticos donde no hay mucho intercambio de nutrientes entre el fondo y la superficie, y más en regiones tropicales donde las corrientes de convección son muy débiles debido a que los cambios de temperatura no son drásticos (Bhupinder, 2013).

Finalmente, se puede decir que el potencial biorremediador de esta macrófita sobre aguas contaminadas es efectivo durante un tiempo máximo de 3 días, si las condiciones nutricionales no son las adecuadas. Posteriores estudios a nivel genético y molecular pueden dar más información de la importancia de esta especie como filtro de aguas residuales o como po-

tencial biorremediador de aguas contaminadas sobre medios acuáticos oligotróficos. Algunas limitaciones para la potencial biorremediación pueden depender de los cambios de pH, la longitud de las raíces y la temperatura.

Referencias

- Agudelo, L. M., Macías K. I. y Suárez, A. J. (2005). Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Red Revista Lasallista*, 2 (1), 57-60.
- Arenas, A., Marcó, LM. y Torres, G. (2011). Evaluation of the plant *Lemna minor* for the bioremediation of water contaminated with mercury. *Revista Avances en Ciencias e Ingeniería*, 2 (3),1-11.
- Bhupinder, D. (2013). *Phytoremediation: Role of aquatic plants in environmental cleanup*. New Delhi (India): Department of Genetics, University of Delhi South Campus.
- De Miguel, E., de Miguel, J. y Curt M. D. (2014). *Manual de Fitodepuración: Filtros de macrófitas en flotación*. Madrid: Fundación Global Nature.
- Ferrera Serrato, R., Rojas Avelizapa, N. G., Poggi Varaldo, H. M., Alarcón, A., Cañizares Villanueva, R. O. (2006). Procesos de Biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, (2), 179-187.
- García, P. y Zamudio, R. (2009). *Habitantes del agua: Macrófitas*. España: Agencia Andaluza del Agua, Consejería de Medio Ambiente.
- Gupta, D. K., Corpas, F. J. y Palma J. M. (2013). *Heavy metal stress in plants*. Granada (España): Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas. Estación Experimental del Zaidín (EEZ).
- Larcher, W. (1995). *Physiological plant ecology, Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. Alemania: Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Leblebici, Z., Aksoy, A., (2011). Growth and Lead Accumulation Capacity of *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae): Interactions with Nutrient Enrichment. *Water, air and soil pollution*, 214 (14),175-184.
- Madigan, M. T. y Martinko, J. M. (2004). *Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson.
- Martelo, J. y Lara, A. J. (2012). Macrófitas flotantes en el tratamiento de aguas residuales; una revisión del estado del arte. *Revista de Ingeniería y Ciencia*, 8 (15), 221-243.
- Mejía Domínguez, C. (2011). *Metales Pesados en Suelos y Plantas: Contaminación y Fitotoxicidad*. Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. Consultado en <https://goo.gl/IXIMtt>.
- Miranda, M.G. y Quiroz, A. (2013). Efecto en la remoción de plomo por *Lemna gibba* L. (Lemnaceae). *Polibotánica*, 36, 147-161.
- Nabila, K. y Mostefa Z. (2013). Phytoaccumulation of zinc using the duckweed *Lemna gibba* L.: effect of temperature, pH and metal source. *Desalination and Water Treatment*, 51 (28-30), 5755-5760.
- Nicholson, F. A., Smith, S.R., Alloway, B. J., Carlton Smithd, C., y Chambers, B.J. (2003). An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *The science of total environment*, 311 (13),205-219.
- Prüss-Ustün, A. y Corvalan, C. (2006).

- Preventing disease through healthy environments. Towards an estimate of the environmental burden of disease.* Switzerland: World Health Organization. Consultado en <https://goo.gl/JKrCG9>.
- Sigel, A. Sigel, H. y Sigel, R. (2009). *Metal ions in life science: Metallothioneins and related chelators*. RSC Publishing.
- Verma, R. y Surindra, S. (2015). Lead and cadmium removal from water using duckweed – *Lemna gibba* L.: Impact of pH and initial metal load. *Alexandria Engineering Journal*, 54 (4), 1297-1304.
- Zeiger, E. y Taiz, L. (2006). *Fisiología vegetal*. (3^{ra} ed.). California: Universidad de California.