

**RESPUESTA DE CRECIMIENTO EN TRES ESPECIES VEGETALES NATIVAS
TROPICALES EMPLEADAS PARA LA FITORREMEDIACION DE LIXIVIADOS
A NIVEL DE MICROCOSMOS**

CINDY JULIANA ACOSTA RAMIREZ



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADEMICO DE BIOLOGIA
SANTIAGO DE CALI**

2012

**RESPUESTA DE CRECIMIENTO EN TRES ESPECIES VEGETALES NATIVAS
TROPICALES EMPLEADAS PARA LA FITORREMEDIACION DE LIXIVIADOS
A NIVEL DE MICROCOSMOS**

CINDY JULIANA ACOSTA RAMIREZ

cindy-shalom@hotmail.com

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga

Director

ENRIQUE JAVIER PEÑA SALAMANCA Ph.D

Profesor Asociado

Departamento de Biología

Codirector

CARLOS ARTURO MADERA PARRA MSc, Ph. D Candidato

Profesor Asistente

Escuela EIDENAR

UNIVERSIDAD DEL VALLE

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGIA

SANTIAGO DE CALI

2012



UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA ACADEMICO DE BIOLOGÍA
SANTIAGO DE CALI

CINDY JULIANA ACOSTA RAMIREZ, 1989

RESPUESTA DE CRECIMIENTO EN TRES ESPECIES VEGETALES NATIVAS
TROPICALES EMPLEADAS PARA LA FITORREMEDIACION DE LIXIVIADOS
A NIVEL DE MICROCOSMOS

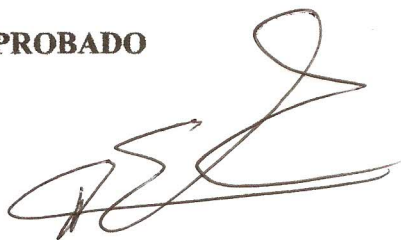
PALABRAS CLAVES:

Fitorremediación, Plantas Hiperacumuladoras, Metales pesados, Humedales construidos, Área foliar, Longitud total, Bioacumulación, Translocación y Lixiviados.

NOTA DE APROBACIÓN

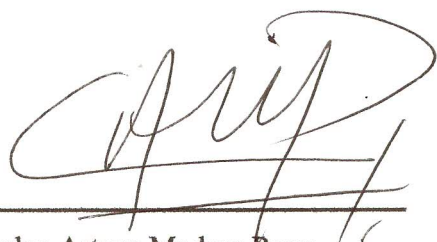
El trabajo de grado titulado “RESPUESTA DE CRECIMIENTO EN TRES ESPECIES VEGETALES NATIVAS TROPICALES EMPLEADAS PARA LA FITORREMEDIACION DE LIXIVIADOS A NIVEL DE MICROCOSMOS”, presentado por la estudiante CINDY JULIANA ACOSTA RAMIREZ, para optar al título de Bióloga, fue revisado por el jurado y calificado como:

APROBADO



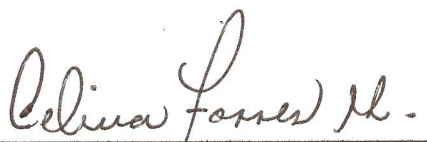
Enrique Javier Peña Salamanca

Director



Carlos Arturo Madera Parra

Codirector



Jurado

DEDICATORIA

A mi padre celestial, mi Dios, por darme la fuerza y la perseverancia en cada día de mi carrera y de mi vida.

A mi madre, por su amor, dedicación, trasnochos, confianza, motivación y por su apoyo incondicional en esta importante etapa de mi vida.

A Nelson, mi profesor personalizado, el amor de mi vida, gracias por su gran amor, por su infinita paciencia, su confianza, compañía y ayuda incondicional en esta etapa de mi vida.

A mi hermano, por su compañía y su apoyo en todos estos años.

A mi padre por el apoyo y confianza que me brindo en toda esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Valle por la excelente formación académica que me brindo.

A los profesores Enrique Peña, Carlos Madera y Jaime Mosquera, por su gran colaboración, paciencia y apoyo en la realización de este trabajo.

A las estudiantes de estadísticas Lina Marcela Díaz Bejarano y Angie Marcela Gaviria Rivera por su gran ayuda.

A mis amigas, por su compañía y todos los momentos compartidos, a Lorena y Jenny quienes me ayudaron en la realización de este trabajo, a mis compañeras del proyecto de investigación Juliana Solarte y Ana Carolina Cárdenas, por su ayuda y apoyo brindado, igualmente a Lina y Sheyla quienes colaboraron de manera activa en la parte experimental.

A los profesores de biología, quienes me brindaron las bases para mi formación académica y que con su ejemplo lograron inspirarme a ser una bióloga integra.

A mi familia, por brindarme todo su cariño y comprensión y acompañarme a alcanzar una de las metas más importantes de mi vida.

A Nelson, el amor que siempre estuvo apoyándome, motivándome y ayudándome en todo momento, por ser un pilar fundamental en mi vida.

Y a Dios quien me dio la fuerza y pasión para lograr, con sacrificio y entrega de todos estos años, ser quien soy hoy.

Muchas gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	XIV
2. INTRODUCCION	15
3. MARCO TEORICO.....	17
3.1 Lixiviados.	17
3.2. Metales Pesados.	17
3.3. Biorremediación.	19
3.4. Plantas hiper.acumuladoras.	20
3.5 Especies vegetales empleadas en fitorremediación para metales pesados.	20
3.6. Humedales construidos.	21
4. ANTECEDENTES	23
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo General.	26
5.2 Objetivos Específicos.....	26
6. HIPOTESIS.....	26
7. MATERIALES Y METODOS.....	27
7.1 Área de estudio.	27
7.2 Especies vegetales estudiadas.	27
7.3 Unidades Experimentales.	29
7.4 Diseño experimental.	31
7.5 Ubicación de los reactores.....	34
7.6 Lixiviado Sintético.	35

7.7 Puntos de muestreo y medición de variables de respuesta.....	38
7.8 Arranque de unidades experimentales.	40
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
8.1. Diámetro del tallo.	41
8.1.1. <i>Gynerium sagittatum</i> (Caña brava). Diámetro del tallo.....	41
8.1.2. <i>Heliconia psittacorum</i> (Heliconia). Diámetro del tallo.	41
8.2. Análisis de Varianza Medidas Repetidas.	42
8.2.1. Diámetro del tallo: <i>Gynerium sagittatum</i>	42
8.2.2. Diámetro del tallo: <i>Heliconia psittacorum</i>	43
8.3. Ajuste de las Curvas de Crecimiento	44
Curvas de Crecimiento	45
Curvas Sigmoidales.....	45
Modelo Gompertz de 3 parámetros	46
Modelo Logístico de 3 parámetros	47
8.3.1. <i>Colocasia esculenta</i> (Oreja de burro). Longitud Total.	48
8.3.2. <i>Heliconia psittacorum</i> (Heliconia). Longitud Total.	50
8.3.3. <i>Gynerium sagittatum</i> (Caña Brava). Longitud Total.	52
8.4. Análisis de Varianza para las tasas de crecimiento máximas.....	54
8.4.1. <i>Colocasia esculenta</i> (Oreja de burro).....	55
8.4.2. <i>Heliconia psittacorum</i> (Heliconia).....	56
8.4.3. <i>Gynerium sagittatum</i> (Caña brava).....	57
8.5 Área foliar.	59
8.6 Metales pesados en los tejidos vegetales.	62
9. CONCLUSIONES	76
10. RECOMENDACIONES	77
LITERATURA CITADA.....	77
ANEXOS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de fitorremediación.	20
Figura 2. Diagrama simplificado de un humedal artificial de flujo subsuperficial.	22
Figura 3. Zona donde está ubicado el lugar de estudio. En la parte izquierda se observa el invernadero dentro de la microestación cuya ubicación se está al lado derecho de la imagen.	27
Figura 4. Diagrama de manejo de las especies vegetales evaluadas.	29
Figura 5. a) Esquema humedales sin escala b) Foto de unidad experimental microcosmos empleada en el estudio.....	29
Figura 6. Montaje experimental (sin escala).	33
Figura 7. Montaje Experimental.	35
Figura 8. Correlación estadística de la DQO y DBO.	37
Figura 9. Crecimiento diámetro del tallo <i>Gynerium sagittatum</i> . Sin concentración de metales (control).	41
Figura 10. Crecimiento diámetro del tallo <i>Heliconia psittacorum</i> . Sin concentración de metales (control).	42
Figura 11. Contraste de esfericidad en SPSS <i>Gynerium sagittatum</i>	42
Figura 12. Contraste de efectos inter-sujetos en SPSS <i>Gynerium sagittatum</i>	43
Figura 13. Contraste de esfericidad en SPSS <i>Heliconia psittacorum</i>	43
Figura 14. Contraste de efectos inter-sujetos en SPSS <i>Heliconia psittacorum</i>	44
Figura 15. Curvas de crecimiento del modelo Gompertz para <i>Colocasia esculenta</i> . Sin concentración de metales: control.	50
Figura 16. Curvas de crecimiento del modelo Logístico para <i>Heliconia psittacorum</i> . Sin concentración de metales: control.	52

Figura 17. Curvas de crecimiento del modelo Logístico de <i>Gynerium sagittatum</i> . Sin concentración de metales: control.	54
Figura 18. Área foliar de <i>Heliconia psittacorum</i> , en los 6 reactores durante el tratamiento. C1: Concentración 1 de metales pesados, C2: Concentración 2 de metales pesados, CT: control, sin concentración de metales, R1: réplica 1, R2: réplica 2.	60
Figura 19. Área foliar de caña brava, <i>Gynerium sagittatum</i> , en los 6 reactores durante el tratamiento. C1: Concentración 1 de metales pesados, C2: Concentración 2 de metales pesados, CT: control, sin concentración de metales, R1: réplica 1, R2: réplica 2.....	60
Figura 20. Área foliar de Oreja de Burro, <i>Colocasia esculenta</i> , en los 6 reactores durante el tratamiento. C1: Concentración 1 de metales pesados, C2: Concentración 2 de metales pesados, CT: control, sin concentración de metales, R1: réplica 1, R2: réplica 2.....	61
Figura 21. Porcentaje de mercurio (Hg +2) en los tejidos vegetales de las tres especies vegetales. CB: Caña Brava- <i>Gynerium sagittatum</i> , OB: Oreja de burro- <i>Colocasia esculenta</i> y HE: <i>Heliconia-Heliconia psittacorum</i>	63
Figura 22. Porcentaje de Cadmio (Cd +2) en los tejidos vegetales de las tres especies vegetales. CB: Caña Brava- <i>Gynerium sagittatum</i> , OB: Oreja de burro- <i>Colocasia esculenta</i> y HE: <i>Heliconia-Heliconia psittacorum</i>	64
Figura 23. Porcentaje de cromo (Cr +6) en los tejidos vegetales de las tres especies vegetales. CB: Caña Brava- <i>Gynerium sagittatum</i> , OB: Oreja de burro- <i>Colocasia esculenta</i> y HE: <i>Heliconia-Heliconia psittacorum</i>	66
Figura 24. Porcentaje de Cromo Total (Cr Total) en los tejidos vegetales de las tres especies vegetales. CB: Caña Brava- <i>Gynerium sagittatum</i> , OB: Oreja de burro- <i>Colocasia esculenta</i> y HE: <i>Heliconia-Heliconia psittacorum</i>	68
Figura 25. Porcentaje de Plomo (Pb) en los tejidos vegetales de las tres especies vegetales. CB: Caña Brava- <i>Gynerium sagittatum</i> , OB: Oreja de burro- <i>Colocasia esculenta</i> y HE: <i>Heliconia-Heliconia psittacorum</i>	70
Figura 26. Factor de translocación de metales pesados en las tres especies vegetales. GS: <i>Gynerium sagittatum</i> , CE: <i>Colocasia esculenta</i> y HEP: <i>Heliconia psittacorum</i>	72

Figura 27. Factor de Bioacumulación de metales pesados en las tres especies vegetales. GS: *Gynerium sagittatum*, CE: *Colocasia esculenta* y HEP: *Heliconia psittacorum*. 73

Figura 28. Posibles mecanismos bioquímicos y moleculares de los metales pesados mediados por la inducción de ROS y el daño al desarrollo de las plantas superiores. Acumulación excesiva de especies de oxígeno reactivas (ROS), metilglioxal (MG) y retención de los aminoácidos, ácidos orgánicos, glutatión (GHS). Modificado de Hossain *et al* 2012. 75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies empleadas en fitorremediación para metales pesados. Modificada de Saad et al. 2009.	21
Tabla 2. Vegetación empleada en sistemas de Humedales Artificiales establecidos en Centroamérica y Suramérica. Modificada de Fuentes 2011.	24
Tabla 3. Información general de las tres especies a evaluar.	28
Tabla 4. Características del medio filtrante utilizado en los humedales construidos ensayo microcosmos.	30
Tabla 5. Especies sembradas en los reactores.	31
Tabla 6. Componentes solución Hoogland.	31
Tabla 7. Composición y características de los tratamientos.	32
Tabla 8. Descripción de los tratamientos ensayo microcosmos.	33
Tabla 9. Concentraciones de micronutrientes para 5 L de solución madre.	38
Tabla 10. Volúmenes empleados de sustancias en lixiviado sintético.	38
Tabla 11. Métodos de medición de las variables de respuesta en las especies vegetales.	39
Tabla 12. Modelo Gompertz ajustado para <i>Colocasia esculenta</i> sin concentración.	48
Tabla 13. Modelo Gompertz ajustado para <i>Colocasia esculenta</i> bajo concentración 1.	49
Tabla 14. Modelo Gompertz ajustado para <i>Colocasia esculenta</i> bajo concentración 2.	49
Tabla 15. Modelo Logístico ajustado para <i>Heliconia psittacorum</i> sin concentración.	51
Tabla 16. Modelo Logístico ajustado para <i>Heliconia psittacorum</i> bajo concentración 1. ...	51
Tabla 17. Modelo Logístico ajustado para <i>Heliconia psittacorum</i> bajo concentración 2. ...	51
Tabla 18. Modelo Logístico ajustado para <i>Gynerium sagittatum</i> sin concentración.	53
Tabla 19. Modelo Logístico ajustado para <i>Gynerium sagittatum</i> bajo concentración 1.	53
Tabla 20. Modelo Logístico ajustado para <i>Gynerium sagittatum</i> bajo concentración 2.	53

Tabla 22. Pruebas simultáneas de Dunnett en <i>Colocasia esculenta</i>	55
Tabla 21. ANOVA de las tasas de crecimiento de <i>Colocasia esculenta</i>	55
Tabla 23. ANOVA de las tasas de crecimiento de <i>Heliconia psittacorum</i>	56
Tabla 24. Pruebas simultáneas de Dunnett en <i>Heliconia psittacorum</i>	57
Tabla 25. ANOVA de las tasas de crecimiento de <i>Gynerium sagittatum</i>	57
Tabla 26. Principales resultados de estudios afines con la investigación actual.	59
Tabla 27. Concentración y porcentajes de mercurio (Hg) en los tejidos vegetales.....	63
Tabla 28. Concentración y porcentajes de cadmio (Cd) en los tejidos vegetales.....	64
Tabla 29. Concentración y porcentajes de cromo (Cr +6) en los tejidos vegetales.....	66
Tabla 30. Concentración y porcentajes de cromo (Total) en los tejidos vegetales.	67
Tabla 31. Concentración y porcentajes de plomo (Pb) en los tejidos vegetales.....	69
Tabla 32. Variables de crecimiento tomadas al inicio y al final del experimento.....	87
Tabla 33. Registro fotográfico de las diferentes fases del proyecto de investigación.....	89

1. RESUMEN

Los lixiviados son el residuo líquido producto del proceso de descomposición de los residuos orgánicos y la percolación de las aguas lluvias en los rellenos sanitarios. Se encuentran diferentes procedimientos para tratar estos residuos que en general son costosos y consumen mucha energía, debido a esto la fitorremediación es una buena alternativa para tratar los lixiviados ya que es más económico que los tratamientos utilizados convencionalmente, además, los nutrientes contenidos en los desechos sirven como fertilizantes de bajo costo para aumentar la producción de la biomasa en plantas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de crecimiento de tres especies vegetales nativas del trópico y su posible uso en la fitorremediación de lixiviados de relleno sanitario, a nivel de microcosmos. Igualmente, analizar el efecto en el crecimiento de las tres especies vegetales por la exposición de las plantas a las dos concentraciones de metales pesados presentes en lixiviados. Durante 63 días se sometieron los individuos de las tres especies vegetales tropicales a un flujo semi-continuo de dos concentraciones de metales pesados presentes en los lixiviados y como control solución Hoogland, en unidades experimentales, humedales construidos de flujo horizontal sub-superficial a escala de microcosmos, evaluando las variables de respuestas para el crecimiento de las especies vegetales a estudiar. Los resultados indicaron que para la especie *Gynerium sagittatum* (Caña brava) en el crecimiento de la longitud total y el diámetro del tallo en la planta no se vieron afectados por el tipo de tratamiento. Con respecto a la especie *Colocasia esculenta* (Oreja de burro) se presentaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos. Por último para la especie *Heliconia psittacorum* (Heliconia) presento mayor crecimiento en la carga de mayor concentración de metal. En cuanto al área foliar no se encontró una influencia del tratamiento en ninguna de las tres especies vegetales. Las tres especies vegetales estudiadas, especialmente *Colocasia esculenta* acumularon altas concentraciones de los metales en sus tejidos fundamentalmente en la raíz lo cual muestran su potencial fitorremedimediador de metales pesados.

2. INTRODUCCION

El relleno sanitario es el método de disposición final de Residuos Sólidos que continua siendo mayormente utilizado en el mundo debido a sus ventajas económicas. Los residuos dispuestos en un relleno sanitario o botadero tienen un considerable y duradero impacto ambiental sobre los recursos agua, aire y suelo, y la salud humana, por los subproductos que allí se producen como lixiviados y gases; varios autores plantean que los potenciales contaminantes permanecen en el relleno de manera significativa por más de 100 años después de haber sido enterrados los residuos; otros manifiestan que el tiempo puede variar de 15 a 50 000 años, incluso 100 000 años. Los metales pesados por ejemplo tienden a concentrarse en los rellenos y son liberados de manera gradual a través del tiempo (Pérez & Rojas 2009).

Los lixiviados son el líquido producido en los rellenos sanitarios como consecuencia de la descomposición de los residuos orgánicos y la percolación de aguas lluvias en el relleno. Los procedimientos para tratar estos productos en general son caros y consumen mucha energía, por esta razón la fitorremediación es una muy buena alternativa para tratarlos ya que es más económico que los tratamientos convencionales, y los nutrientes contenidos en los desechos sirven como fertilizantes baratos para aumentar la producción de la biomasa en plantas. Las diferencias en la composición de lixiviados, concentraciones y tipos de metales pesados, dependen del relleno sanitario, de las condiciones de suelo y del clima (Dimitriou & Aronsson 2005). Sin embargo, para llevar a cabo la fitorremediación se requiere plantas hiperacumuladoras como *Thlaspi caerulescens*, *Brassica juncea* y *Pteris vittata* L. ya que concentran o acumulan altas cantidades de contaminantes. No obstante algunas características de estas plantas se ven afectadas negativamente a causa de esta exposición, disminuyendo el crecimiento y la biomasa además el sistema de raíces se hace poco profundo (Roongtanakiat 2009). Por esto es importante medir el efecto de los lixiviados en el crecimiento de las especies vegetales.

La producción de residuos sólidos (RS) es alarmante, no solo por las actividades consumistas de los seres humanos, sino por las consecuencias que conlleva a la contaminación de los suelos, las fuentes hídricas y el aire, que llegan a causar graves afecciones a la diversidad biológica y por supuesto a la población humana, algunos estudios

reflejan este crecimiento en la producción de los RS, información reportada en el Plan de Gestión Integral de Residuos Sólidos (PGIRS) de la ciudad de Cali en el 2004, muestra que la producción per cápita (PPC) municipal era en promedio de 0,725 kg/hab por día, para el 2008 la población de la ciudad genera aproximadamente 1591 ton/día de residuos sólidos. Con el crecimiento poblacional, los cambios en los estándares y estilos de vida y la producción de nuevos productos, se estima que la generación de residuos se incrementa significativamente. Aunque la urbanización no necesariamente es un factor de incidencia, el crecimiento desorganizado y no planeado puede generar problemas adicionales en el manejo de residuos sólidos (UNEP 2001 citado por Pérez & Rojas 2009).

En la ciudad de Cali, la composición física de los residuos tiene un fuerte componente de orgánicos de rápida degradación, alcanzando un porcentaje del 59% del total de residuos sólidos; Se reconoce que los impactos ambientales de sustancias tóxicas generadas por la disposición final de residuos sólidos municipales - RSM se han incrementado a una tasa alarmante, especialmente por los metales pesados en los lixiviados (Pérez & Rojas 2009).

Los Humedales construidos (HC) han sido usados por décadas, principalmente para el tratamiento de agua residual doméstica o municipal, sin embargo, recientemente se han empleado para muchos otros tipos que incluyen agua residual industrial, agrícola, petrolera, lixiviados de rellenos y escorrentía de agua lluvia. Los humedales construidos de flujo horizontal sub-superficial (HCFS) basados en su compleja dinámica de procesos físico-químicos y biológicos, eliminan una gran diversidad de contaminantes presentes en el agua, razón por la cual se están empleando actualmente en el tratamiento de los lixiviados de rellenos sanitarios (Nivala et al. 2007, Vymazal 2009).

Muchas de las especies tropicales han sido evaluadas por su capacidad fitoremediadora, por lo que en este estudio se demostró la importancia de *Colocasia esculenta*, *Heliconia psittacorum* y *Gynnerium sagittatum* en su papel como plantas con características para su uso en el sistemas de tratamiento de lixiviados, humedales construidos de flujo horizontal sub-superficial (HCFS). El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de crecimiento de tres especies vegetales tropicales plantadas en humedales construidos sub-superficiales

de flujo horizontal para el tratamiento de lixiviado de relleno sanitario bajo dos condiciones de concentración de metales pesados a escala de microcosmos. El presente estudio se desarrolló en el marco del proyecto “Humedales construidos para el tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios con plantas tropicales” (COWETLA), financiado por UNESCO-IHE de Holanda.

3. MARCO TEORICO

3.1 Lixiviados.

El lixiviado es un líquido comúnmente hallado y asociado a rellenos sanitarios resultado de la desintegración de los compuestos orgánicos y la percolación de aguas lluvias a través de los desechos sólidos que reaccionan con los productos en descomposición de la basura. Si el relleno sanitario no tiene sistema de recolección de lixiviado, estos pueden alcanzar las aguas subterráneas y causar problemas medio ambientales y de salud (Morales 2007).

Además los lixiviados son altamente variables en cuanto a su composición, concentraciones y tipos de metales pesados, que dependen de múltiples factores como el relleno sanitario del que provienen, de las condiciones de suelo y de los factores climáticos. (Dimitriou & Aronsson, 2005).

Otros factores, tales como: la composición de la basura, edad del relleno, balance de agua, diseño y operación del relleno sanitario, solubilidad de los desechos, procesos de conversión microbiológica y química además de la interacción del lixiviado con el medio ambiente dificultan más su tratamiento. (Contreras & Suarez, 2006).

3.2. Metales Pesados.

Los metales pesados son aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g cm^{-3} cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos), que en concentraciones excesivas puede llegar a ser tóxico (Navarro et al. 2007). Por esto la presencia de metales pesados en los lixiviados representa un grave problema ambiental y de salud pública.

Los metales pesados se clasifican en dos grupos:

Oligoelementos o micronutrientes. Necesarios en pequeñas cantidades para los organismos, pero tóxicos una vez pasado cierto umbral. Incluyen As, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni y Zn.

Sin función biológica conocida. Son altamente tóxicos, e incluyen Ba, Cd, Hg, Pb, Sb y Bi. (Navarro et al. 2007).

Teniendo en cuenta que los metales presentes en los lixiviados del relleno sanitario de Navarro, (parecido en composición al vertedero Presidente en San Pedro – Valle del Cauca), que superan los límites permitidos y están provocando un impacto negativo en los ciudadanos, son el cadmio, el plomo, el cobre y el mercurio, estos son los metales empleados en este proyecto, además estos metales pesados son considerados altamente tóxicos para el ser humano, siendo el plomo el segundo en la lista de los metales pesados más tóxicos según La Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR), este elemento es empleado en tuberías, baterías, pesticidas, entre otros usos, el mercurio ocupa el tercer lugar, al oxidarse a Hg^{+2} en el organismo, circula en la sangre, tiene el potencial de dañar el tracto gastrointestinal, afecta la formación de esperma, causa insuficiencia renal, afecta el sistema inmunológico, altera los sistemas genéticos, las enzimas, daña el sistema nervioso (como la coordinación y los sentidos del tacto, gusto y vista), (CIS, 2003 citado Aulestia, 2012); el séptimo metal más toxico es el cadmio (ATSDR, 2008), es biopersistente, dentro de los efectos negativos a la exposición de este metal se han identificado: obstrucción de pulmones (cáncer), afecta los huesos (osteoporosis), incrementa presión en la sangre; por último el cromo hexavalente (Cr^{+6}), es un elemento altamente tóxico para el ser humano y está clasificado por la IARC (International Agency for Research on Cancer) en el grupo I (cancerígeno comprobado en humanos). (CIS, 2003 citado Aulestia, 2012).

3.3. Biorremediación.

La biorremediación se refiere a la transformación química de los contaminantes, como los metales pesados mediante el uso de microorganismos o plantas que satisfacen sus requerimientos nutrimentales y de energía contribuyendo a la desintoxicación del ambiente por mineralización o co-metabolismo, entre las diferentes opciones técnicas de remediación, la fitorremediación ocupa un lugar importante porque es una tecnología emergente basada en la acción combinada de plantas (terrestres o acuáticas) con comunidades microbianas (López et al. 2005).

En este caso la fitorremediación es una práctica para llevar a cabo un tratamiento sobre los lixiviados, buscando reducir los niveles de carga contaminante a través del uso de especies vegetales que se supone tienen la capacidad de resistir dichos componentes, acumularlos e incluso transformar el contenido químico en biomasa. La fitoremediación puede involucrar dos procesos: la fitoestabilización y la fitoextracción. La primera reduce a niveles constantes la contaminación del suelo o la biodisponibilidad del metal pesado, mientras que la fitoextracción usa plantas para extraer el contaminante del suelo. Otra tecnología prometedora es la rizofiltración que se puede utilizar para eliminar contaminantes como metales pesados de aguas contaminadas utilizando raíces de plantas. (Miranda *et al*, 2008, citado por Aulestia 2012).

En los últimos tiempos se ha producido un considerable avance en la utilización de las plantas en esta problemática, siendo una herramienta de gran importancia en la biorremediación (fitorremediación), ya que el uso de plantas para tratar suelos y aguas contaminadas, se ha convertido en una alternativa promisorio para recuperar metales de manera económica y ambientalmente amigable, (Gardea et al. 2004), especialmente se ha manejado de manera eficaz en la descontaminación de metales pesados (Navarro et al. 2007).

Algunas plantas que tienen un potencial fitorremediador son hiper-acumuladoras (Peña *et al.*, 2005). Estas plantas pueden acumular uno o más metales pesados, a niveles cien veces

más altos que el ambiente circundante y que otras especies creciendo bajo las mismas condiciones ambientales (Pilon-Smits 2005).

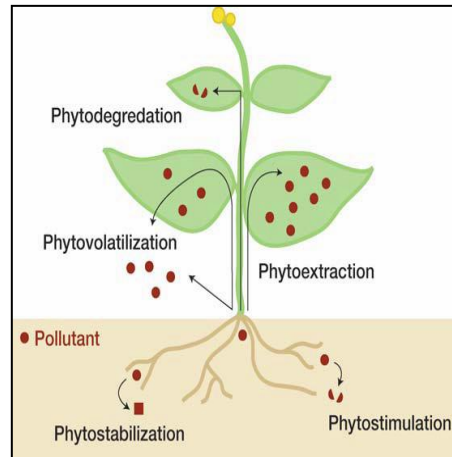


Figura 1. Mecanismos de fitorremediación.
Fuente: Pilon-Smits, 2005

3.4. Plantas hiper.acumuladoras.

Una planta es una hiper acumuladora, si cumple con los siguientes criterios:

1. Las concentraciones de metales pesados en los brotes de las plantas deben alcanzar el nivel de hiper acumulación, que es diferente para los diferentes metales pesados, por ejemplo, es más de 1000 mg kg⁻¹ para Pb, Cu, y el Cr, y más de 10.000 mg kg⁻¹ para el Zn.
2. Las concentraciones de metales pesados en los brotes debe ser 10-500 veces mayor que los de planta normal.
3. La concentración de MP en los brotes debe ser siempre mayor en las raíces.
4. Un coeficiente de enriquecimiento (la relación de concentración de metal en proyectar desde el suelo) debe ser mayor que uno (Brown et al., 1994 citado por Kausar *et al.* 2012).

3.5 Especies vegetales empleadas en fitorremediación para metales pesados.

Algunas de las especies con buena capacidad de acumulación de metales pesados son:

Thlaspi rotundifolium, *Minuartia verna*, *Thlaspi goesigense*, *Allysum bertholoni*, *Berkheya*

codii, *Psycotria douarrei*, *Miconia lutescens*, *Melastoma malabathricum* (Barceló & Poschnrider 2003), entre otras especies descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Especies empleadas en fitorremediación para metales pesados. Modificada de Saad et al. 2009.

ESPECIE VEGETAL	CONTAMINANTE (MP)	ESPECIE VEGETAL	CONTAMINANTE (MP)
<i>Agropyron elongatum</i>	Niquel (Ni)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Niquel (Ni)
<i>Arabidopsis sp.</i>	Cu, Zn, Hg, As, Se, Ni.	<i>Phragmites australis</i>	Cromo (Cr)
<i>Arabidopsis halleri</i>	As, Cd, Pb, y Zn.	<i>Pteris biaurita</i>	Arsénico (As)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Niquel (Ni)	<i>Pteris cretica</i>	Arsénico (As)
<i>Astragalus bisulcatus</i>	Selenio (Se)	<i>Pteris vittata</i>	Arsénico (As)
<i>Athyrium yokoscense</i>	Cu, Pb, Fe, y Zn.	<i>Pteris vittata L.</i>	Arsénico (As)
<i>Bidens maximowicziana</i>	Plomo (Pb)	<i>Ricinus communis</i>	Niquel (Ni)
<i>Brachiaria decumbens</i>	Cromo (Cr)	<i>Sesbania cannabina</i>	Fe, Zn, Cu, Pb y Ni.
<i>Brassica juncea</i>	Niquel (Ni)	<i>Silene vulgaris</i>	Zn y Cd.
<i>Brassica napus</i>	Selenio (Se)	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ni, Zn, Cd, As y Pb.
<i>Chlorella sp.</i>	Ni y Hg.	<i>Solanum nigrum L.</i>	Cadmio (Cd)
<i>Festuca arundinacea</i>	Selenio (Se)	<i>Sorgum vulgare</i>	Niquel (Ni)
<i>Gentiana pennelliana</i>	Pb, Cu, y Zn.	<i>Spartina patens</i>	Selenio (Se)
<i>Hordeum vulgare</i>	Phosphorus uranium	<i>Spartina pectinata</i>	titanium (III)
<i>Hordeum vulgare</i>	Niquel (Ni)	<i>Spinacea oleracea</i>	Niquel (Ni)
<i>Indian Mustard</i>	Selenio (Se)	<i>Sporobulus airoides</i>	Selenio (Se)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Niquel (Ni)	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Zn y Cd.
<i>Penisetum purpureum</i>	Cromo (Cr)		

3.6. Humedales construidos.

Los humedales construidos de flujo horizontal sub-superficial (HCFS) (Figura 1) se han usado de manera eficiente y con excelentes resultados en diferentes países como Canadá,

Estados Unidos, Noruega, Eslovenia, Reino Unido, y Polonia, para el tratamiento de lixiviados (Vymazal 2011). Pero en el trópico no hay estudios donde se utilizan los humedales construidos, por ende es importante estudiar la eficiencia tanto del humedal construido, como el de las especies vegetales, para la remoción de esos contaminantes.



Figura 2. Diagrama simplificado de un humedal artificial de flujo subsuperficial.

Fuente Biosystems International. <http://www.biosystems.com.uy/img/humedales-esquema.jpg>

El tratamiento óptimo de lixiviado que permita alcanzar una completa reducción del impacto negativo sobre el ambiente y la salud, es hoy en día un reto. Las variaciones en el lixiviado, en particular las variaciones de sitio en sitio y a través del tiempo, indica que la más adecuada tecnología de tratamiento de este residuo debe ser simple, universal y adaptable. En este caso, los Humedales Construidos (HC) que es una eco-tecnología de tratamiento con gran potencial para este tipo de residuos (Madera 2011).

Los HC tiene la ventaja de ser un sistema sostenible, de grandes periodos de tiempo con bajo costo de operación y mantenimiento. Esto es especialmente importante para el control de lixiviado, el cual a menudo requiere sistemas de tratamiento con periodos de vida indefinidos. En contraste con las alternativas químicas y físicas, los HC pueden proveer una seguridad frente a nuevos contaminantes no conocidos. Además, con una demanda energética básica como es de luz solar para la fotosíntesis, actividad que es direccionador del proceso natural en todas las tecnologías basados en plantas y algas. Uno de los tipos más apropiado para el tratamiento de lixiviado es el humedal construido sub-superficial de flujo horizontal (HCSFH) (Vymazal, 2009).

4. ANTECEDENTES

Los lixiviados, que contienen altos niveles de metales pesados, no tienen un tratamiento adecuado antes de llegar a los ríos, según estudios de una muestra de 194 municipios de 28 departamentos incluyendo las capitales, encontró que en el 73% de las localidades los lixiviados son vertidos a fuentes hídricas sin tratamiento previo (Procuraduría Delegada Agraria 2004). En Colombia menos del 20% de los Lixiviados (LX) son tratados. Teniendo en cuenta esta problemática los HC se perfilan como una atractiva tecnología para el tratamiento de LX.

En el caso del recurso agua afectado por el relleno sanitario de Navarro, ya inexistente, los estudios “Factores ambientales asociados a la ocurrencia de Malformaciones Congénitas (MFC) en la ciudad de Cali”, e “Impacto del relleno sanitario de Navarro de la ciudad de Cali en la Salud, en el ambiente biofísico y social y los costos en salud-BN”, realizado por grupos de investigación multidisciplinarios de las Facultades de Salud, Ingeniería y Ciencias exactas de la Universidad del Valle en el 2009, muestran como el lixiviado de este botadero es un residuo líquido altamente contaminante y cuya pluma ha alcanzado las fuentes hídricas superficiales como el río Cauca, en donde se detectó la presencia de xenobióticos de metales pesados como cadmio, plomo, mercurio y cobre en concentraciones que superan los límites permisibles para este tipo de fuente. En el recurso suelo, se encontró concentraciones por encima de los límites permisibles de cadmio, cobre y plomo en los terrenos cercanos al botadero de Navarro y los dos primeros en la franja de suelo que conecta este sitio con la zona urbana de varias comunas de Cali. Este recurso puede igualmente contaminar la matriz agua a través de la percolación o escorrentía en época de lluvias (Pérez & Rojas 2009).

La presencia de estos contaminantes en agua (superficial y subterránea) y suelo, independiente del nivel de la concentración de los mismos, implica altos riesgos ecológicos ya que las matrices bióticas y abióticas están siendo contaminadas, reduciendo los servicios ambientales que estas pueden prestar; y los efectos a la salud pueden potenciarse por la contribución de otras matrices como animales y vegetales que consiguen acumular y magnificar los xenobióticos, cuya ruta de transmisión puede ser la cadena alimenticia. Los

alimentos vegetales al ser regados por estas aguas pueden concentrar tales contaminantes al igual que los animales, como los peces, en donde el estudio MFC reportó la presencia de metales pesados como mercurio (Hg) en el músculo de dos variedades de peces comúnmente llamados “Corroncho y Bocachico” y que hace parte de la dieta alimenticia de la población de bajos recursos que habita en la zona conocida como “Aguablanca”. Estos contaminantes están asociados a la ocurrencia de malformaciones congénitas y enfermedades carcinogénicas (Pérez & Rojas 2009).

En los últimos tiempos se ha producido un considerable avance en la utilización de las plantas en esta problemática, siendo una herramienta de gran importancia en la biorremediación (fitorremediación), ya que el uso de plantas para tratar suelos y aguas contaminadas, se ha convertido en una alternativa promisorio para recuperar metales de manera económica y ambientalmente amigable, (Gardea et al. 2004), especialmente se ha manejado de manera eficaz en la descontaminación de metales pesados (Navarro et al. 2007). Para Humedales construidos se ha trabajado con especies vegetales propias del trópico como las que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Vegetación empleada en sistemas de Humedales Artificiales establecidos en Centroamérica y Suramérica. Modificada de Fuentes 2011.

País	Vegetación
Brasil	<i>Oryza sativa</i> y <i>Zizaniopsis bonariensis</i>
Colombia	<i>Typha angustifolia</i> , <i>Musa velutina</i> , <i>Alocasia macrorrhiza</i> , <i>Scirpus holoschoenus</i> , <i>Typha latifolia</i> , <i>Heliconia psittacorum</i>
Costa Rica	<i>Coix lacryma-jobi</i>
Ecuador	<i>Echinochloa polystachia</i> , <i>Panicum maximum</i>
El Salvador	<i>Pennisetum purpureum</i>
Honduras	<i>Zea mays</i>
Jamaica	<i>Gynerium sagittatum</i>
Nicaragua	<i>Cyperus articulatus</i> , <i>Pennisetum purpureum</i> , <i>Pharalis arundinacea</i> , <i>Phragmites australis</i> y <i>Typha dominguensis</i>
Uruguay	<i>Typha dominguensis</i>
Venezuela	<i>Typha dominguensis</i> y <i>Paspalum virgatum</i>

Los metales pesados tienen efectos en el desarrollo de las plantas, estos se pueden observar en su crecimiento, en su eficiencia fisiológica y cambios morfológicos. (Hossain *et al*

2012). Los resultados obtenidos en un estudio realizado por Mantilla & Rivas (1997), en donde las plantas de *Leucaena leucocephala* estuvieron sometidas a una carga contaminantes (aguas residuales), mostraron que la altura de la planta, el diámetro del tallo en la base y las ramificaciones fueron afectados por los tratamientos aplicados. También en la investigación en humedales construidos plantados con *Cyperus flabelliformis* Rottb y *Vetiveria zizanioides* se pudo observar la diferencia en las tasas de remoción e índices de crecimiento (el crecimiento de los brotes, la biomasa, actividad de la raíz, el incremento de la biomasa de raíces), según el tipo de especie usada en el humedal, estos resultados sugieren que el efecto de crecimiento de las plantas en la eliminación de contaminantes en humedales construidos depende de la plantas y los contaminantes. (Cheng *et al* 2009).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General.

- Evaluar la respuesta de crecimiento de tres especies vegetales nativas tropicales y su uso en la fitorremediación de lixiviados de relleno sanitario, a escala de microcosmos.

5.2 Objetivos Específicos.

- Analizar el comportamiento temporal del crecimiento de las especies sometidas a cada una de las concentraciones de metales pesados.
- Evaluar el efecto de la variación de la concentración de metales pesados en el crecimiento de 3 especies vegetales y su uso en la fitorremediación de lixiviados de relleno sanitario.
- Evaluar el efecto en el crecimiento por la acumulación de los metales pesados en los órganos de las especies vegetales.

6. HIPOTESIS

- Las especies vegetales en estudio expuestas a las concentraciones de metales pesados no presentan diferencias de crecimiento entre ellas.
- La concentración de metales pesados en el lixiviado no afecta el crecimiento de las especies vegetales en estudio.

7. MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó a escala de microcosmos, una unidad de investigación de muy pequeña escala que se emplea generalmente para estudios experimentales con modelos biológicos y que busca reproducir en condiciones controladas de laboratorio lo que ocurre en la realidad, además fue dentro de una estación experimental, invernadero con el fin de garantizar las mismas condiciones de exposición solar, humedad relativa entre otros parámetros que afecten a cada especie.

7.1 Área de estudio.

El proyecto de investigación se llevó a cabo dentro del invernadero en la microestación de biología que se encuentra ubicada en el interior de la Universidad del Valle, en el campus de Meléndez, ubicada en Cali-Valle del cauca. ($3^{\circ} 22' 23.64''$ N, $76^{\circ} 31' 54.15''$ O), Figura 3.

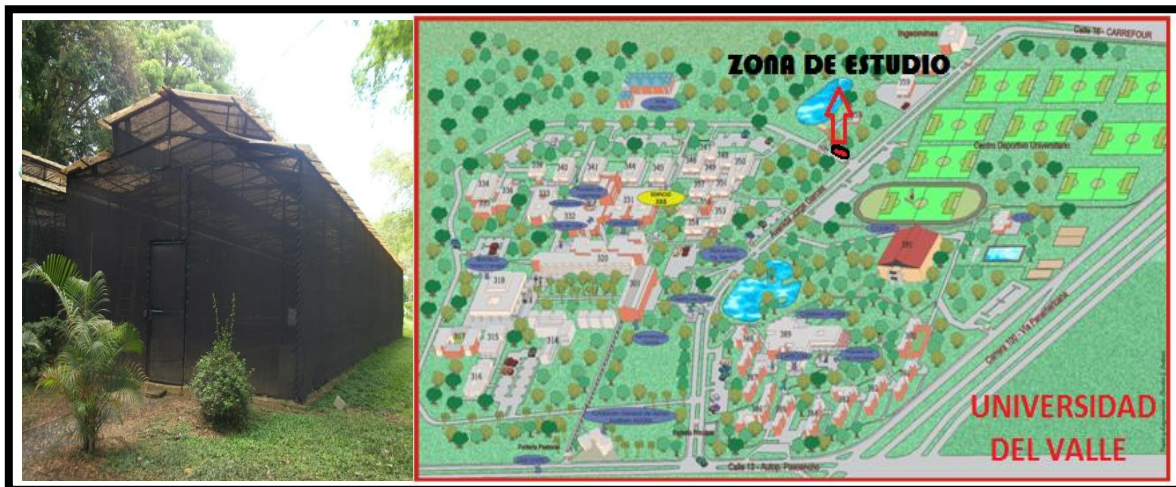


Figura 3. Zona donde está ubicado el lugar de estudio. En la parte izquierda se observa el invernadero dentro de la microestación cuya ubicación se está al lado derecho de la imagen.

7.2 Especies vegetales estudiadas.

Las especies utilizadas en la investigación fueron seleccionadas con base en los resultados del estudio “Efecto en el crecimiento y fisiología en 11 especies vegetales regadas con lixiviado del relleno sanitario de Presidente” (Vásquez y Torres, 2010) y del estudio “Respuesta fisiológica de tres especies vegetales nativas sometidas a tratamiento con

lixiviado de relleno sanitario”(Aulestia, K. 2012), además estas especies resisten humedades altas, ya que sus hábitats naturales son de bosques húmedos y premontanos. (SIAC 2008 citado por Torres & Vázquez 2010), las especies empleadas fueron: *Colocasia esculenta* (Oreja de Burro), *Heliconia psittacorum* y *Gynerium sagittatum* (Caña Brava), (Tabla 3). La siembra de las especies vegetales se hizo por esquejes (comprados en vivero comercial las dos primeras y la última tomada de la orilla del río Meléndez, Cali, Colombia), durante 4 semanas se mantuvieron bajo la condición de vivero. Se cultivaron alrededor de 40 plantas de cada especie, las cuales alcanzaron una altura promedio de 15 cm. Posteriormente las plantas en edad juvenil se sembraron en los reactores, como se observa en la figura 4.

Tabla 3. Información general de las tres especies a evaluar.

Nombre Común	Familia	Genero	Nombre Científico	Imagen
Caña brava	Poaceae	<i>Gynerium</i>	<i>Gynerium sagittatum</i>	
Oreja de Burro	Araceae	<i>Colocasia</i>	<i>Colocasia esculenta</i>	
Heliconia	Heliconiaceae	<i>Heliconia</i>	<i>Heliconia psittacorum</i>	

La Figura 4 presenta el esquema utilizado para el manejo de las plantas.

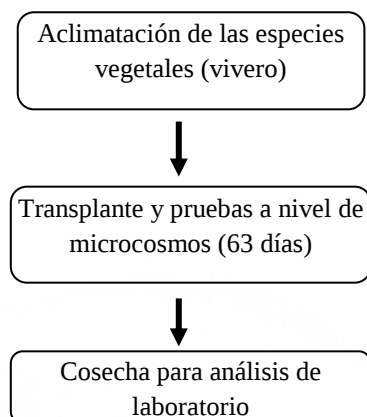


Figura 4. Diagrama de manejo de las especies vegetales evaluadas.

Tomado y adaptado de Shiyab et al., (2009).

7.3 Unidades Experimentales.

Las unidades experimentales utilizadas fueron los Humedales construidos subsuperficiales de flujo horizontal (HCFSS), un microcosmos, (Yang et al., 2001 citado por Madera 2011), donde se incorporaron las especies vegetales (un reactor por especie), cada uno con dimensiones de 0,6 m x 0,3 m x 0,5 m largo, ancho y alto respectivamente, y una altura del nivel de agua de 0,40 m, los humedales fueron construidos en fibra de vidrio (450 gr) y resina poliéster. La Figura 5 presenta un esquema de los reactores utilizados en el estudio (a) y una foto de la unidad (b).

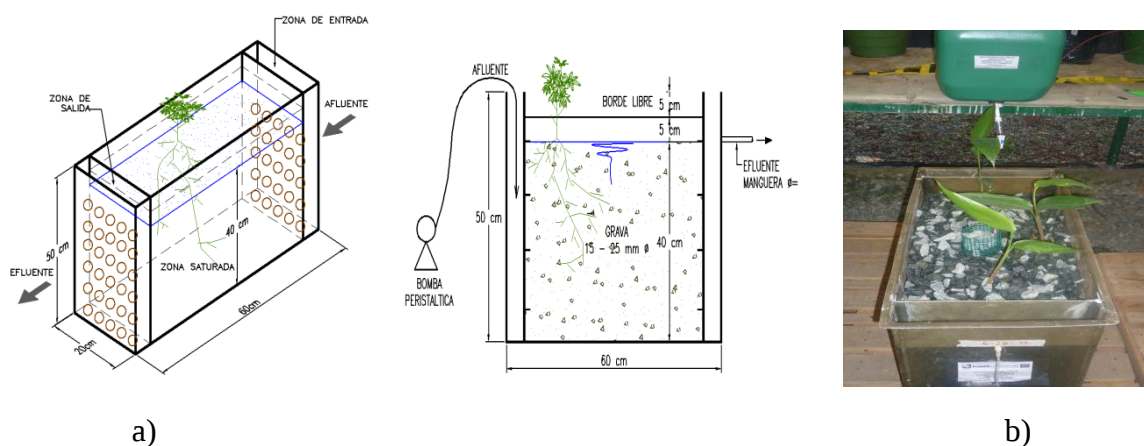


Figura 5. a) Esquema humedales sin escala b) Foto de unidad experimental microcosmos empleada en el estudio.

El sistema de alimentación de los reactores se hizo a gravedad por medio de tanques alimentadores para cada unidad. Para permitir que los humedales funcionaran bajo flujo semi-continuo por espacio de ocho (8) horas al día con una caudal $0.010 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$, que equivale a un tiempo nominal de retención hidráulica (TRH) de 3 días, y para garantizar el suministro de lixiviado sintético con flujo estable y controlado a los microcosmos, se utilizó un sistema conformado por tanque plástico de almacenamiento y un dispositivo de goteo (venoclises) en cada unidad.

Antes de realizar el llenado de los reactores con el medio filtrante (grava), este material fue lavado con abundante agua y una solución al 5% de hipoclorito de sodio para eliminación de posibles microorganismos. La grava fue de tamaño mediano de diámetro 25, 4 mm y una altura de 0,45 m. En la Tabla 4 se presentan las características de este material.

Tabla 4. Características del medio filtrante utilizado en los humedales construidos ensayo microcosmos.

Tipo de Material	Tamaño Efectivo D_{10} (mm)	Porosidad, n (%)	Conductividad Hidráulica k_s ($\text{m}^3/\text{m}^2/\text{d}$)	Densidad real Kg m^{-3}
Grava Media	25	38,86	1100,076	2650

Fuente: Laboratorio de Suelos, Universidad Nacional Sede Palmira, 2011.

Para definir la selección de las plantas a sembrar en cada reactor se efectuó empleando el software R 2.10. El número de individuos sembrados en cada reactor fue de 3 (densidad $20 \text{ plantas m}^{-2}$), lo que implicó que en total se sembraron 18 plantas por especie vegetal (3 plantas por reactor y seis reactores con la misma especie vegetal). El universo total de plantas por especie fue de: *Heliconia Psittacorum* 30, *Gynerium Sagittatum* 30, *Colocasia esculenta* 32. Las plantas fueron numeradas del 1 hasta al N, para de esta forma proceder mediante R seleccionar las plantas. Los códigos que se usaron en el programa R para la asignación aleatoria de cada planta en las unidades experimentales o reactores, se encuentran en el anexo 1.

Los resultados de las plantas seleccionadas se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Especies sembradas en los reactores.

Reactores	<i>Heliconia psittacorum</i> Plantas seleccionadas	<i>Gynerium sagittatum</i> Plantas seleccionadas	<i>Colocasia esculenta</i> Plantas seleccionadas
Reactor C1R1	10 17 29	13 26 14	18 8 16
Reactor C1R2	23 27 5	1 24 25	20 10 11
Reactor C2R1	26 13 25	2 31 23	2 5 21
Reactor C2R2	20 19 16	15 27 10	26 1 4
Reactor CR1	18 3 8	5 16 3	24 3 25
Reactor CR2	6 28 14	6 18 30	15 6 12

C1: Factor 1, concentración 1 de metales. C2: Factor 2, concentración 2 de metales, R1: Réplica 1; R2: Réplica 2; C: Control, sin concentración de metales.

7.4 Diseño experimental.

En este estudio se realizó de manera controlada las siguientes condiciones que a su vez representan los factores de diseño:

1. Tipo de plantas, tres especies tropicales *Gynerium sagittatum*, *Colocasia esculenta* y *Heliconia psittacorum*.
2. Solución de exposición: De acuerdo a los objetivos planteados se realizó la exposición de las especies a cada una de las dos concentraciones de los cuatro metales pesados (Cd, Cr, Pb y Hg) en el lixiviado sintético, pero fiel a las condiciones verdaderas del lixiviado por medio de caracterizaciones previas y otras que se efectuaron durante el trabajo de investigación, muestras traídas del Relleno Sanitario de Presidente (Municipio de San Pedro – Valle del Cauca). La tercera solución fue agua potable (sin cloro) más solución Hoogland como tratamiento control, ya que esta contiene sales con todos los nutrientes que garantizan las condiciones óptimas para el crecimiento de la planta. La Tabla 6, presenta los componentes de la solución Hoogland empleada.

Tabla 6. Componentes solución Hoogland

Componente	Cantidad (ml)
Ca(NO ₃)	2.5
KNO ₃	2.5
MgSO ₄	1.0
Fe EDTA	0.5
Micronutrientes*	0.1

Fuente: Hoogaln and Arnon, (1938), citado por Shiyab et al., (2009)

La composición y características de los tratamientos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Composición y características de los tratamientos.

Parámetros	Número de muestras	Tratamiento		
		Concentración 1 de metales	Concentración 2 de metales	Sin concentración de metales (control)
Temperatura (° C)	48	23,21	23,35	23,09
Conductividad eléctrica (dS/m)	48	1482,54	1512	145,17
Potencial redox (mV)	48	222,56	224,89	251,64
Oxígeno disuelto (mg/L)	48	4,15	4,13	4,06
pH (Un)	48	5,23	5,14	6,89
DQO (mg L ⁻¹)	8	735,5	735,5	-
NTK (mg L ⁻¹)	8	132,50	132,50	-
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	8	99,36	99,36	-
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	8	1,62	1,62	-
P-PO ₄ (mg L ⁻¹)	6	7,28	7,28	-
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	6	391,67	391,67	-
Cadmio-Cd²⁺ (µg L⁻¹)	5	86,33	253,6	-
Plomo-Pb²⁺ (µg L⁻¹)	5	283,77	593,87	-
Cromo-Cr⁶⁺ (µg L⁻¹)	5	1183,65	2016,45	-
Cromo-Total (µg L⁻¹)	5	1644	2266	-
Mercurio-Hg²⁺ (µg L⁻¹)	5	60,37	71,57	-

Al disponer de dos factores cada uno con tres niveles, la combinación de los niveles genera 9 tratamientos diferentes a aplicar sobre las unidades experimentales.

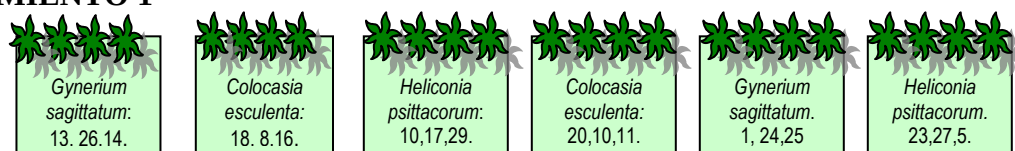
Para tener una estimación de la variabilidad del experimento es necesario tener réplicas, pero por restricciones de tipo presupuestal, temporal, espacial y de logística se plantea la ejecución de dos replicaciones de cada tratamiento. En total el estudio se llevó a cabo con 18 unidades experimentales o reactores los cuales estuvieron distribuidos tal como se ilustra en la Figura 6. El trabajo se realizó para los dos factores de manera simultánea. La Tabla 8 describe los tratamientos de la investigación.

Tabla 8. Descripción de los tratamientos ensayo microcosmos.

Tratamiento	Especie Vegetal	Concentración metal pesado aplicada (Cd, Cr, Pb y Hg)
1	E1	C1
1	E2	C1
1	E3	C1
2	E1	C2
2	E2	C2
2	E3	C2
9 (control)	E1	Agua limpia sin metales+ Hoogland
10 (control)	E2	Agua limpia sin metales+ Hoogland
11 (control)	E3	Agua limpia sin metales+ Hoogland

E1: *Gynerium sagittatum*, E2: *Heliconia psittacorum*, E3: *Colocasia esculenta*

TRATAMIENTO 1



TRATAMIENTO 2

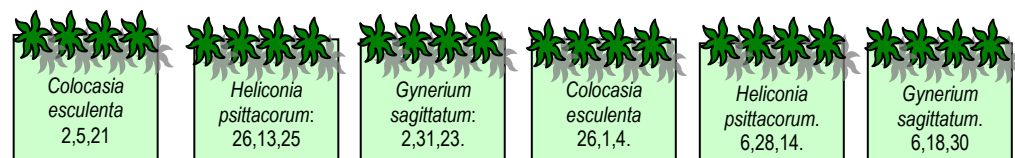


Figura 6. Montaje experimental (sin escala).

Manejo de datos.

Primero se realizó un análisis exploratorio por medio de la evaluación y del comportamiento temporal de las figuras para las diferentes variables de respuesta en cada unidad experimental, también se realizaron los cálculos de tasa de crecimiento por unidad experimental, realizando comparaciones descriptiva entre tasas de variación por factor además se efectuaron figuras de puntos por factor y por tratamiento sobre la medida final, sin dejar de contrastar con el control, fue necesario hacer uso de técnicas de curvas de crecimiento donde se analizó las posibles diferencias en las tasas de crecimiento D para los 3 tratamientos (concentración 1, concentración 2 y sin concentración de metales pesados), en la variable longitud total, realizados en el software estadístico Minitab versión 15, de

este modo desarrollar una comparación entre las tasas de crecimiento y por otro lado ejecutar ANOVA de medidas repetidas Multimuestra en el software estadístico SPSS versión 19 (2010), para realizar las comparaciones entre el conjunto de datos obtenidos, donde fuera posible para comparar directamente el efecto de los distintos niveles de concentración de metales pesados. Se plantearon las siguientes hipótesis estadísticas:

- H_0 : Hipótesis Nula: La concentración de metales pesados en el lixiviado no afecta el crecimiento de las especies vegetales en estudio.
- H_a : Hipótesis alterna: La concentración de metales pesados en el lixiviado afecta el crecimiento de las especies vegetales en estudio.

Así mismo, se determinó el supuesto de esfericidad probado a un nivel de significancia del 5% (0,05) para establecer el tipo de análisis a realizar. Se utilizó el estadístico F univariado, aplicando el índice corrector llamado épsilon. Para poder utilizar el estadístico F univariado se corrigieron los grados de libertad de F . Este índice corrector expresa el grado en que la matriz de varianzas – covarianzas se aleja de la esfericidad y ofrece dos estimaciones: Greenhouse-Greisser (Greisser & Greenhouse, 1958) y Huynh-Feldt (1976), siendo la primera de ellas la más conservadora. Para el contraste de las pruebas de las hipótesis se utilizó una significancia del 5%, con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el test de Dunett para determinar cuál de los 2 niveles de contaminante difería directamente con el nivel establecido como control (sin concentración de metales).

7.5 Ubicación de los reactores.

Dado que se tuvo dos factores de trabajo, fue necesario definir la ubicación de los reactores en el área de estudio. Este trabajo se realizó de manera aleatoria empleando para ello el paquete estadístico R 2.10. Para generar la aleatorización se empleó códigos en el programa R. (Anexo 2).

De acuerdo con los resultados que arrojó el programa la ubicación de los reactores y estos se instalaron sobre estibas que elevaron las unidades entre 10 y 15 cm del suelo, condición que permitió el aislamiento térmico del suelo y facilitar la recolección del efluente. (Figura 7).

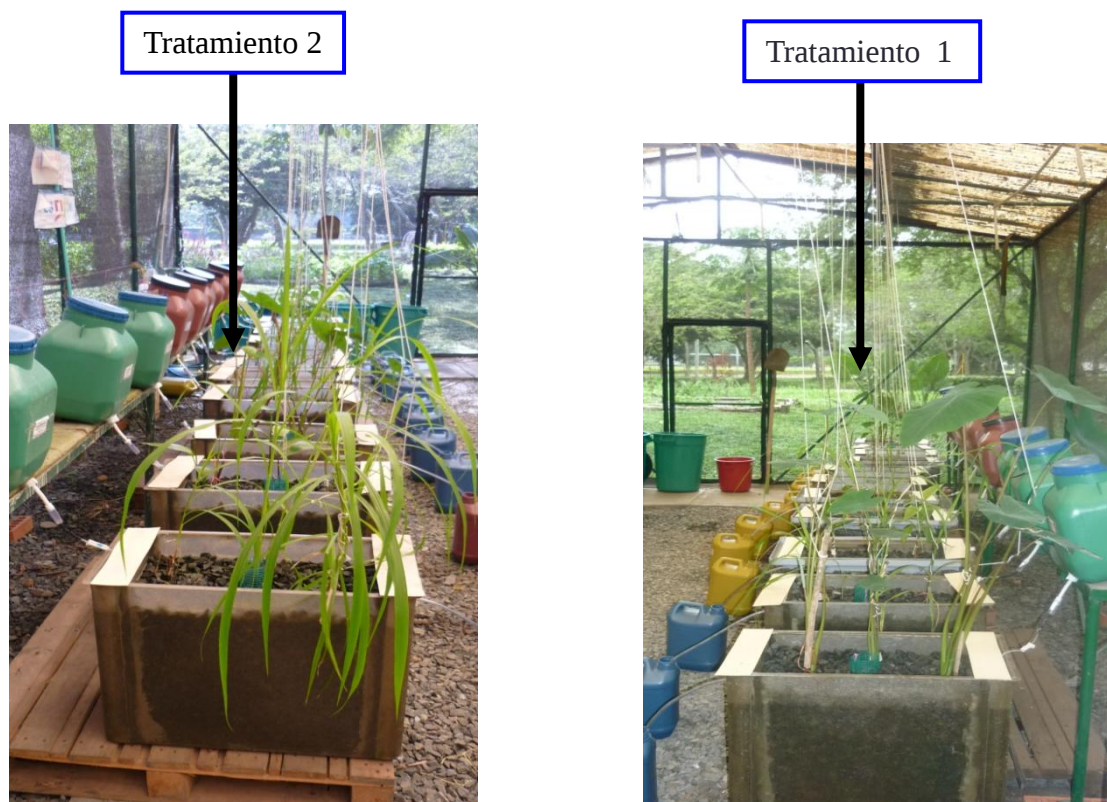


Figura 7. Montaje Experimental.

En cada una de las unidades experimentales que trabajaron con las concentraciones de metales pesados, se ubicó a 0,25 m de la entrada en el sentido del flujo se instaló un cilindro de diámetro 76,2 mm en malla plástica (diámetro orificio malla de 19,05 mm), el cual se rellenó con grava y al final del experimento, se tomaron las muestras para la determinación del contenido de metales pesados y análisis de microbiológico en el medio filtrante de cada uno de estos cilindros.

7.6 Lixiviado Sintético.

Dado que el objetivo central de esta etapa de la investigación era establecer la capacidad fitoremediadora de las especies vegetales (*Colocasia esculenta*, *Heliconia psittacorum* y *Gynerium sagittatum*) y en la perspectiva de reducir potenciales efectos inhibitorios sobre este proceso, se decidió trabajar con lixiviado sintético, condición recomendada en otros estudios (Nan et al., 2006; Liu et al., 2007; Zhi-xin et al., 2007; Papazoglou, 2007;

Bonfranceschi et al., 2009; Ling-li et al., 2009; Shiyab et al., 2009; Liu et al, 2010; Giri & Patel., 2011). Citado por Madera 2011.

Con base en los datos de caracterización del lixiviado crudo del relleno de Presidente reportados por BUGASEO (2010) para el periodo 2006-2010 y los valores obtenidos en las caracterizaciones de Torres y Vásquez (2010) y ECOQUIMICA (2011), se hizo un análisis estadístico de esta información a través del software R versión 14 de 2010, buscando encontrar una correlación de los datos del contenido de materia orgánica (DQO) del lixiviado real con la DBO₅. En la Figura 8, presenta la correlación entre la DQO y la DBO₅ (ecuación 1), con un r^2 del 92%. Así mismo, se describen los algoritmos empleados en R para este trabajo. (Anexo 3).

$$DBO = 368.738 + 0.378 DQO = 2922.51 \text{ mg L}^{-1} \text{ (Ecuación 1)}$$

$$DQO = 6756 \text{ mg L}^{-1} \text{ (promedio periodo 2008 a 2011).}$$

El lixiviado sintético se preparó buscando simular las características del lixiviado real y que haya sido parcialmente tratado a través de una Laguna Anaerobia de Alta Tasa (60% eliminación materia orgánica- DQO, Peña, 2002 y 2003; Mara, 2003) y compuesto por los principales ácidos grasos volátiles de cadena corta-AGVs- (ácido acético, propiónico y butanoico) encontrados después de la fermentación ácida durante el tratamiento primario de aguas residuales con lagunas anaerobias. La DQO utilizada fue en promedio de 500 mg L⁻¹. Acorde con los resultados encontrado por Moreno (2009), la composición de la DQO del lixiviado de Presidente luego de ser evaluada la biodegradabilidad anaeróbica fue de: C₂:C₃:C₄ (ácido acético: propiónico: butanóico) 73%:23%:4% respectivamente, relación que fue empleada para la preparación del lixiviado sintético y cuyos reactivos fueron ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemania, pureza > 99,9%), propiónico (Alfa Aesar, USA, 99,4% pureza) y butanoico (Panreac, USA, 99,5% pureza).

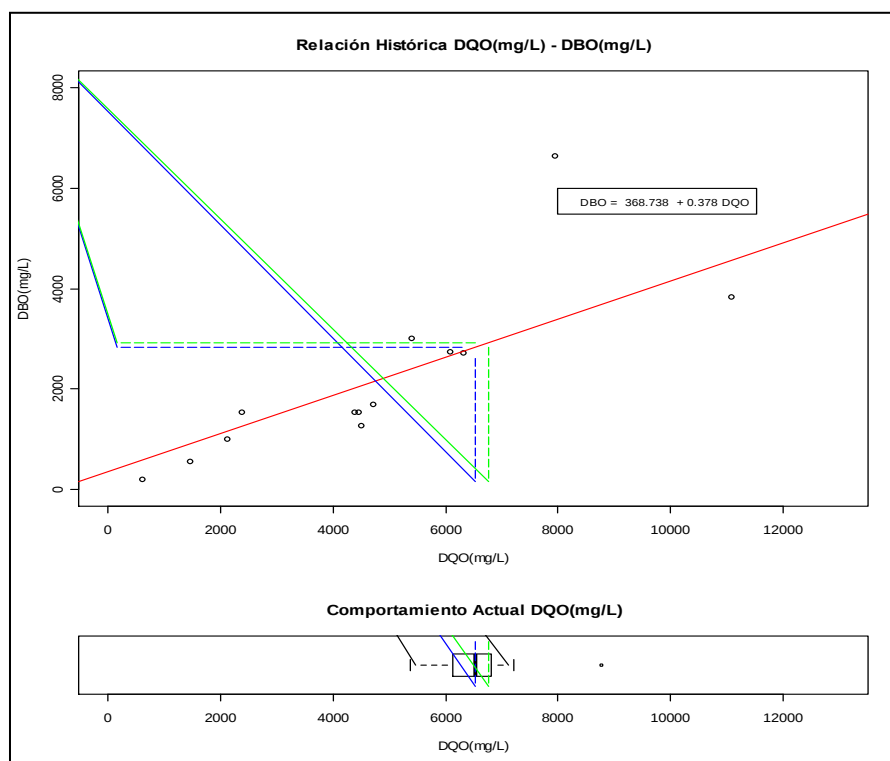


Figura 8. Correlación estadística de la DQO y DBO.

En el caso de los metales pesado se emplearon sales como cloruro de mercurio (HgCl_2) (Merck, 99,6% pureza); Sulfato de plomo (PbSO_4) (Merck, 99,9% pureza); Dicromato de Potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (Merck, 99,9% pureza); CdCl_2 (Merck, 99,9% pureza), buscando concentraciones entre 5 a 10 veces superior a la concentración promedio encontrada en el lixiviado real.

Respecto al amonio, acorde con Clark & Baldwin, 2002 y Peña, E. 2009, citado por Aulestia 2012, las concentraciones de este contaminante superior a 300 mg L^{-1} es tóxico para las plantas, razón por la cual se optó trabajar con una concentración de 100 mg L^{-1} de amonio y para su preparación se empleó cloruro de amonio (Merck, 99,9% pureza); En relación al Fosforo, acorde con el análisis estadístico de los datos de caracterización para este nutriente en el lixiviado real la concentración es de 10 mg L^{-1} , se trabajó con una concentración de 7 mg L^{-1} y donde se empleó KH_2PO_4 (Merck, 99% pureza); finalmente para los micronutrientes, las concentraciones utilizadas se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones de micronutrientes para 5 L de solución madre.

Micronutriente	Concentración (mg/L)
Calcio (Ca)	0,075
Magnesio (Mg)	0,500
Manganeso (Mn)	0,500
Hierro (Fe)	5,000

Todos los elementos fueron preparados de manera independiente en soluciones stock de volumen entre 0,5 y 1 Litro según el contaminante y para su elaboración se utilizó agua destilada y diariamente de las soluciones madres se tomaban alícuotas para la preparación del Lixiviado sintético con el cual se alimentó los reactores. En la Tabla 10, se presentan los volúmenes de las alícuotas tomadas para la preparación diaria del lixiviado sintético. Por la adición de los ácidos y las sales metálicas, el pH del lixiviado descendió a valores de 4 unidades, razón por la cual se adicionó NaOH al 1% que permitió elevarlo a valores cercanos 6 unidades.

Tabla 10. Volúmenes empleados de sustancias en lixiviado sintético.

Substancia	Concentración solución madre	Volumen solución madre (L)	Concentración contaminante en el LX mg L ⁻¹	Cantidad (mL) solución madre utilizado para preparar Lixiviado
A Acético mg L ⁻¹	491,3	1.3	358,6	1.0
A Propiónico mg L ⁻¹	491,3	0.4	113	0.3
A Butanoico mg L ⁻¹	491,3	0.1	19,7	0.1
Amonio g/l	1509,2	1	100	16,7
Fosforo g/l	84317	0,6	7	16,7
Cd ⁺² * mg L ⁻¹	100	1	0,15/0,3	39,6/79,2
Hg ⁺² *+ mg L ⁻¹	111,7/220	0,4	0,0305/0,060	13,3
Pb ⁺² * mg L ⁻¹	2600/3400	1	0,75/1,0	16,7
Cr ⁺⁶ * mg L ⁻¹	9600/12800	1	0,75/1,0	16,7

* Valores (a/b): a: Concentración 1 del metal; b: concentración 2 del metal.

+ Soluciones madres preparada cada 15 días para minimizar formación de precipitados.

7.7 Puntos de muestreo y medición de variables de respuesta.

En la planta, se midió biomasa fresca para lo cual se pesaron todas las plantas al inicio y al final del experimento. Así mismo, se determinó la acumulación de los metales pesados en tejido subterráneo (raíces) y aéreo (tallos, ramas y hojas), labor realizada al inicio y final de la experimentación, para lo cual se tomaron muestras de 4 a 5 gr peso en seco; en tejido aéreo adicionalmente se midieron variables de crecimiento como longitud de planta, diámetro de tallo, área foliar y número inicial y final de hojas. Para las mediciones de crecimiento se

trabajó en una sola planta por reactor escogida aleatoriamente y en el caso del área foliar se tomó datos en tres hojas de la planta seleccionada. La Tabla 11 muestra un consolidado de las mediciones efectuadas en las especies vegetales para las dos condiciones de trabajo.

Tabla 11. Métodos de medición de las variables de respuesta en las especies vegetales.

Variables	Frecuencia de Medición	Unidad	Instrumento	Total de datos
Longitud total	1 Semanal	cm	Metro o regla	648
Diámetro de tallo	1 Semanal	cm	Metro	648
Área foliar	1 Quincenal	cm ²	Fotos analizadas con Scion©	324
* Cadmio-Cd ²⁺	Inicio y final experimento	mg kg ⁻¹	Absorción atómica con horno de grafito.	40
* Plomo-Pb ²⁺	Inicio y final experimento	mg kg ⁻¹	Absorción atómica con horno de grafito.	40
* Cromo-Cr ⁶⁺	Inicio y final experimento	mg kg ⁻¹	Absorción atómica con horno de grafito.	40
* Mercurio-Hg ²⁺	Inicio y final experimento	mg kg ⁻¹	Absorción atómica con horno de grafito.	40
Biomasa	Inicio y final experimento	kg	Balanza	132

* Las mediciones en las plantas se harán en tejidos de raíz, rama y hoja.

La medición de la longitud total y el diámetro del tallo se realizó cada ocho días, una vez por semana, la longitud o altura total se tomó desde la parte visible del tallo, este punto asignado desde la primera semana de muestreo (ya que una parte del tallo siempre estaba cubierto por la grava) hasta el final de este, el diámetro se determinó rodeando el tallo con el metro, siempre en el mismo punto marcado aproximadamente en la parte central del tallo, esta marca fue realizada desde la primera medición. Cada hoja se encontraba marcada con un número a medida que nacía una se le asignaba el número con marcador permanente.

En lo referente al área foliar, esta se midió con el programa Scion© image que analiza las imágenes o fotografías en formato .bmp (Imagen de mapa de bits). En este programa se escoge una escala dentro de la imagen (1 cm) y luego se selecciona la superficie que se necesita hallar, la cantidad de píxeles seleccionados y que el programa reconoce nos arroja el área foliar determinada.

Al finalizar la experimentación las especies empleadas en el estudio (*Colocasia esculenta*, *Gynerium sagittatum* y *Heliconia psittacorum*), fueron retiradas de forma completa de las respectivas unidades. Todas las plantas fueron pesadas y medidas su longitud total. Posteriormente se cortaron en los diferentes tejidos (raíz, tallo, rama y hojas) y fueron nuevamente pesados en una balanza digital (FENIX, LEXUS electronics Scale), de cada órganos se tomaron muestras para medir la cantidad de metales pesados en cada uno de los tejidos, según los protocolos (Anexo 4).

7.8 Arranque de unidades experimentales.

Para reducir el tiempo de adaptación de los microcosmos, el sistema se trabajó bajo condición batch. Los reactores se llenaron con 28 L de agua sin cloro, 5 L del efluente de la laguna anaerobia del sistema de tratamiento de aguas residuales domésticas de Ginebra, Valle del Cauca, 14 L del efluente de un HCFSS sembrado con *Heliconia psittacorum* que trata aguas residuales domesticas ubicado en la PTAR-Ginebra. Bajo esta condición de batch los reactores trabajaron por tres semanas.

Posteriormente, las plantas fueron sembradas en los reactores y estos funcionaron bajo flujo semi-continuo, para lo cual se le aplicó durante 8 horas 10 L de agua sin cloro, condición que se mantuvo por una semana. Luego durante una semana se aplicó a las unidades lixiviado sintético solamente compuesto de materia orgánica (ácidos grasos de cadena corta) con una concentración de 250 mg L^{-1} de DQO. Durante este tiempo los humedales que contenían las especies vegetales adicionalmente se alimentaron con un litro de solución hoogland cada semana por reactor para facilitar la aclimatación de las plantas a los humedales. Finalmente, en la fase de experimentación se aplicó el lixiviado sintético a evaluar en las dos concentraciones y los reactores control se regaron con agua sin cloro y la solución hoogland, durante este tiempo los reactores operaron con el caudal de diseño ($0,01 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$) y en condiciones de flujo semi-continuo (8 horas por día).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Diámetro del tallo.

En el caso de *Colocasia esculenta* (Oreja de Burro) no fue posible medir el diámetro de su tallo durante los dos meses de investigación solo al inicio y al final, ya que este órgano de la planta es subterráneo.

8.1.1. *Gynerium sagittatum* (Caña brava). Diámetro del tallo.

En la Figura 9, se visualizan los 3 tipos de tratamientos: se observa que no hubo diferencia en el crecimiento del diámetro para las distintos tratamientos, sin embargo el tratamiento sin carga contaminante (control) presenta mayor crecimiento para la variable diámetro del tallo en la especie Caña Brava, *Gynerium sagittatum*.

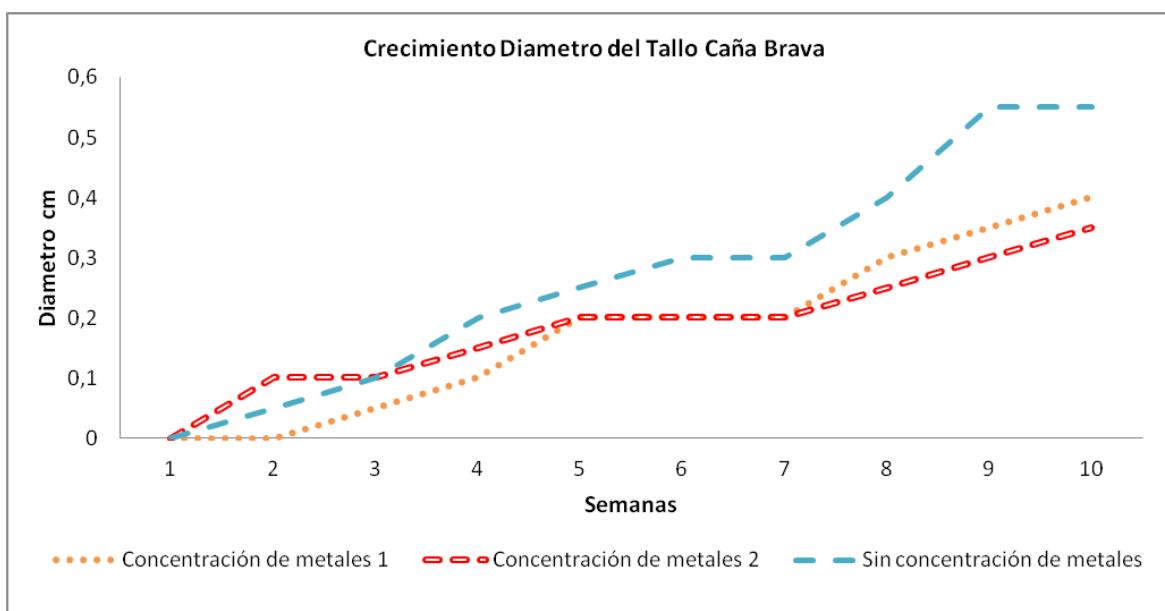


Figura 9. Crecimiento diámetro del tallo *Gynerium sagittatum*. Sin concentración de metales (control).

8.1.2. *Heliconia psittacorum* (Heliconia). Diámetro del tallo.

En la Figura 10 se observa el diámetro del tallo en *Heliconia psittacorum* donde no se evidencian diferencias en el crecimiento del diámetro para los distintos tratamientos, a excepción del tratamiento control (sin carga contaminante) ya que presenta un crecimiento mayor en las semanas 9 y 10.

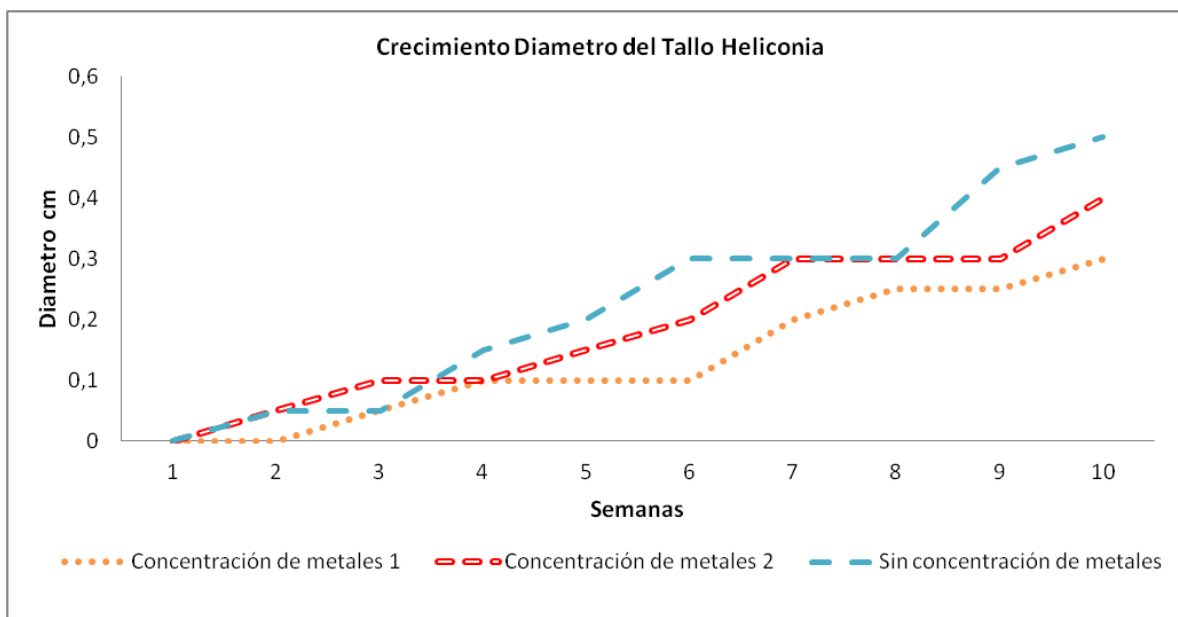


Figura 10. Crecimiento diámetro del tallo *Heliconia psittacorum*. Sin concentración de metales (control).

8.2. Análisis de Varianza Medidas Repetidas.

8.2.1. Diámetro del tallo: *Gynerium sagittatum*

El supuesto de normalidad, generó el valor p de 0,000204, lo cual indica que los datos no siguen una distribución normal. Respecto al análisis del supuesto de esfericidad para evaluar la homogeneidad de varianzas, se realizó la corrección para los grados de libertad de Geisser y Greenhouse. (Figura 11).

Prueba de esfericidad de Mauchly^b

Medida: MEASURE_1

Efecto Intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Sig.	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
tiempo	,000	.	44	.	,209	,924	,111

Figura 11. Contraste de esfericidad en SPSS *Gynerium sagittatum*.

Ajuste del modelo

La corrección de Geisser y Greenhouse para evaluar la significancia de la interacción entre el tratamiento y el tiempo, fue de 29,5%, con lo cual se concluye que no existe una interacción significativa entre el tiempo y el tipo de tratamiento. Para el efecto del factor tiempo, el nivel de significancia obtenido por la corrección para los grados de libertad de

Geisser y Greenhouse es de 0,001%, por lo cual se puede concluir que existe un efecto del tiempo sobre el crecimiento del diámetro en la especie *Gynerium sagittatum*. Pero como se observa en la figura 12 muestra para el efecto del factor tipo de tratamiento no existe un efecto del tipo de tratamiento sobre el crecimiento del diámetro.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida: MEASURE_1
Variable transformada: Promedio

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	2,688	1	2,688	129,032	,001
carga	,102	2	,051	2,456	,233
Error	,063	3	,021		

Figura 12. Contraste de efectos inter-sujetos en SPSS *Gynerium sagittatum*.

8.2.2. Diámetro del tallo: *Heliconia psittacorum*

Para *Heliconia psittacorum*, el supuesto de normalidad, con un valor p asociado es 0,000191, indican que los datos no siguen una distribución normal, en cuanto al análisis del supuesto de esfericidad para evaluar la homogeneidad de varianzas, se realizó la corrección para los grados de libertad de Geisser y Greenhouse (Figura 13).

Prueba de esfericidad de Mauchly^b

Medida: MEASURE_1

Efecto Intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Sig.	Epsilon ^a		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
tiempo	,000	.	44	.	,220	1,000	,111

Figura 13. Contraste de esfericidad en SPSS *Heliconia psittacorum*.

Ajuste del modelo

La corrección de Geisser y Greenhouse para evaluar la significancia de la interacción entre el tratamiento y el tiempo, fue de 39,2% por ende se concluye que no hay interacción entre el tiempo y el tipo de tratamiento (concentración 1, concentración 2 y sin concentración de metales pesados), dado que no existe dicha interacción se analizó el efecto del tiempo y de la carga por separado.

Para el efecto del factor tiempo es de 0.01%, por lo cual se puede concluir que existe un efecto del tiempo sobre el crecimiento del diámetro. La figura 14 indica que para el efecto del factor tipo de tratamiento el nivel de significancia fue de 63,8%, por lo cual se puede concluir que no existe un efecto del tipo de tratamiento sobre el crecimiento del diámetro de la especie *Heliconia psittacorum*.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Medida: MEASURE_1
Variable transformada: Promedio

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	2,053	1	2,053	23,649	,017
Carga	,091	2	,045	,524	,638
Error	,261	3	,087		

Figura 14. Contraste de efectos inter-sujetos en SPSS *Heliconia psittacorum*.

Estudios como el realizado por Mantilla & Rivas (1997) se observa que la altura de la planta aumenta cuando la concentración de contaminantes en este caso aguas residuales entre 75% y 100%, mientras que el diámetro de la base del tallo disminuyó significativamente con concentraciones altas. Pero en este estudio el diámetro del tallo no se vio afectado por el riego con lixiviado creció durante el tiempo de experimentación pero similares al crecimiento en condiciones normales, lo que indica que en cuanto al diámetro del tallo todas las especies toleraron y se aclimataron a la carga de metales contaminante.

8.3. Ajuste de las Curvas de Crecimiento

El crecimiento depende directamente de la fotosíntesis, la respiración, la división celular, la elongación, la diferenciación, entre otros, y que además está influenciada por factores como temperatura, intensidad de luz, disponibilidad de agua y de nutrientes. Conjuntamente el crecimiento en campo es dependiente de la variación genética y de las condiciones ambientales (relación planta-suelo-atmósfera). (Barrera *et al* 2010), por ende en mayor o menor proporción todas las plantas de las tres especies vegetales crecieron durante toda la experimentación y esto se ve reflejado en los datos tomados al inicio y al final del experimento. (Anexo 5 y 6).

Curvas de Crecimiento

Una curva de crecimiento es un modelo empírico de la evolución de una cantidad en el tiempo, las curvas de crecimiento son ampliamente utilizados en la biología para describir cantidades tales como tamaño de la población, crecimiento de una planta o de sus características morfológicas en función del tiempo.¹

Curvas Sigmoidales

Las curvas de tipo sigmoidal son una de las tantas curvas de crecimiento que modelan datos biológicos, entre las características que describen una curva de tipo sigmoidal es que muestran una progresión desde comienzos pequeños que se aceleran y se acerca a su clímax con el tiempo. En las plantas la curva de crecimiento presenta un comportamiento sigmoidal es decir que la curva tiende a tener una forma de S, esto se debe a que durante la etapa inicial (la fase de retardo), la tasa de crecimiento de las plantas es lento y luego aumenta rápidamente durante la fase exponencial o logarítmica en ella el crecimiento se da rápidamente y de forma lineal, después de algún tiempo la tasa de crecimiento disminuye lentamente debido a la limitación de nutrientes, esta fase constituye la fase estacionaria o de envejecimiento. (Zwitering & Rombouts 1990 y Barrera *et al* 2010).

Entre los modelos matemáticos más utilizados para describir el comportamiento de este tipo de curvas se encuentran el modelo logístico y el modelo de Gompertz, los cuales se encuentran expresados de manera general por las siguientes ecuaciones (Zwitering & Rombouts 1990):

$$\text{Gompertz: } y = \exp^{\exp^{-x}}$$

$$\text{Logístico: } y = \frac{1}{1 + \exp^{-x}}$$

Los modelos logístico y Gompertz de 3 parámetros resultan ser los más adecuados para describir el crecimiento de plantas debido a que se caracterizan por que en su fase inicial cuenta con un periodo de retraso λ , luego se presenta una aceleración de su crecimiento a un valor máximo μ , y posteriormente la tasa de crecimiento se estabiliza hasta que una

¹ Extraído del documento final de la consultoría estadística. Díaz & Gaviria, 2012.

asíntota A es alcanzada, a continuación se describen las ecuaciones para los dos modelos y sus respectivos parámetros (Zwitering & Rombouts 1990):

Modelo Gompertz de 3 parámetros

Se evaluó el modelo Gompertz de 3 parámetros cuya ecuación puede ser escrita como:

$$y = a \cdot \exp \{-\exp \{b-ct\}\}$$

Estimación de los parámetros Gompertz (μ , λ , A).

Para la estimación de los parámetros correspondiente al valor máximo de crecimiento μ , el periodo de retraso λ y el parámetro que describe la estabilización de la tasa de crecimiento A se utilizan la primera y segunda derivada obteniendo:

El punto de inflexión de la curva se obtiene a partir de la segunda derivada de la función con respecto a t :

$$\frac{dy}{dt} = ac \cdot e^{-e^{(b-ct)}} \cdot e^{(b-ct)}$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} = ac^2 \cdot e^{-e^{(b-ct)}} \cdot e^{(b-ct)} \cdot [e^{(b-ct)} - 1]$$

En el punto de inflexión donde $t = t_i$ la segunda derivada es igual a cero:

$$\frac{d^2y}{dt^2} = 0 \rightarrow t_i = \frac{b}{c}$$

Una expresión para la tasa máxima de crecimiento puede ser obtenida al evaluar la primera derivada en el punto de inflexión obteniendo:

$$\mu = \left(\frac{dy}{dt} \right)_{t_i} = \frac{ac}{e}$$

La descripción de la línea tangente a través del punto de inflexión es:

$$y = \mu \cdot t + \frac{a}{16e} - \mu t_i$$

Por lo tanto el tiempo de retraso (λ) es definido como el intercepto en el eje t de la tangente

$$\text{a través del punto de inflexión: } \lambda = \frac{(b-1)}{\mu c} \quad 0 = \mu c \lambda + \frac{a}{e} - \mu t_i$$

Despejando de esta última ecuación se obtiene el valor del tiempo de retraso λ :

El valor asintótico A es alcanzado cuando t se acerca al infinito: $t \rightarrow \infty : y \rightarrow A = a$

El parámetro a puede ser sustituido por A obteniendo la ecuación modificada de Gompertz:

$$y = A \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Modelo Logístico de 3 parámetros

Posee el mismo número de parámetros que el modelo Gompertz, sin embargo la diferencia radica en el punto de inflexión ubicado entre las 2 asíntotas:

$$y = \frac{a}{1 + e^{(b-ct)}}$$

Estimación de los parámetros Modelo logístico (μ, λ, A)

El punto de inflexión de la curva se obtiene a partir de la segunda derivada de la función con respecto a t : En el punto de inflexión donde $t = t_i$ la segunda derivada es igual a cero:

$$\frac{d^2y}{dt^2} = 0 \rightarrow t_i = \frac{b}{c}$$

Una expresión para la tasa máxima de crecimiento puede ser obtenida al evaluar la primera derivada en el punto de inflexión obteniendo:

$$\mu = \left(\frac{dy}{dt} \right)_{t_i} = \frac{ac}{4}$$

Dónde: $c = \frac{4\mu}{a}$

El tiempo de retraso (λ) es definido como el intercepto en el eje t de la tangente a través del punto de inflexión:

$$\lambda = \frac{(b-2)}{c}$$

El valor asíntótico A es alcanzado cuando t se acerca al infinito:

$$t \rightarrow \infty : y \rightarrow A = \frac{a}{2}$$

El parámetro $a/2$ y b puede ser sustituido por A y $\frac{4\mu}{\lambda} + 2$ obteniendo la ecuación logística modificada:

$$y = \frac{A}{\left\{ 1 + \exp \left[\frac{4\mu}{A} (\lambda - t) + 2 \right] \right\}}$$

A continuación se presenta los resultados obtenidos respecto al ajuste de curvas de crecimiento para las hojas en cada una de las especies vegetales.

Se analizó principalmente el parámetro D el cual define la tasa de crecimiento máxima alcanzada por las hojas de la planta durante el periodo de observación.

8.3.1. *Colocasia esculenta* (Oreja de burro). Longitud Total.

Para la especie *Colocasia esculenta* el modelo de crecimiento que mejor ajuste obtuvo a los datos fue el modelo de Gompertz de 3 parámetros. En la tabla 12 se muestra los valores para las hojas sometidas a la concentración sin metales pesados ni contaminantes, por cada una de las réplicas y para cada hoja.

Para los cuatro modelos se obtuvieron varianzas pequeñas lo que apoya que los modelos ajustados en el tratamiento control son adecuados. Respecto a la tasa de retraso o fase inicial λ para todas las hojas se pueden considerar prácticamente cero, al parecer esto se debe a que las hojas ya estaban en crecimiento cuando inicio el periodo de observación, y con relación a la asíntota A es donde se estabiliza el crecimiento, y varía dependiendo de la edad en la que se encuentre, debido a que algunas tendrán mayor asíntota que otras porque apenas estaban naciendo.

Tabla 12. Modelo Gompertz ajustado para *Colocasia esculenta* sin concentración.

<i>CTR1</i>	<i>Hoja 1</i>	$\sigma^2 = 1,3356$	<i>Ajust: Gompertz</i>	<i>Hoja 2</i>	$\sigma^2 = 0,1259$	<i>Ajust: Gompertz</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	23.04	1.76	(19.59; 26.49)	35.10	1.57	(32.03; 38.18)
λ	0.02	0.11	(-0.20; 0.23)	-0.03	0.05	(-0.12; 0.07)
A	57.43	0.60	(56.26; 58.60)	59.85	0.25	(59.35; 60.35)
<i>CTR2</i>	<i>Hoja 1</i>	$\sigma^2 = 0,2400$	<i>Ajust: Gompertz</i>	<i>Hoja 2</i>	$\sigma^2 = 0,0995$	<i>Ajust: Gompertz</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	22.79	1.13	(20.57; 25.01)	30.41	0.90	(28.64; 32.18)
λ	-0.85	0.11	(-1.06; -0.65)	-0.29	0.04	(-0.37; -0.20)
A	65.95	0.32	(65.33; 66.57)	69.38	0.28	(68.84; 69.92)

En la tabla 13 se tienen los parámetros estimados para las curvas de crecimiento ajustadas a las hojas de las plantas que fueron sometidas a la concentración 1 de metales pesados.

Para los cuatro modelos se obtuvieron varianzas pequeñas lo que apoya que los modelos ajustados en esta concentración 1 de metales pesados son adecuados. Respecto a la tasa de

retraso o de la fase inicial λ para todas hojas se pueden considerar prácticamente cero y con relación a la asíntota A o valor en cm donde se estabiliza el crecimiento, varía dependiendo de la edad en la que se encuentran, similar a lo que sucede en el tratamiento control.

Tabla 13. Modelo Gompertz ajustado para *Colocasia esculenta* bajo concentración 1.

<i>C1R1</i>	<i>Hoja 1</i>	$\hat{\sigma}^2:0.618$	<i>Ajust: Gompertz</i>	<i>Hoja 2</i>	$\hat{\sigma}^2:0.3295$	<i>Ajust: Gompertz</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	15.22	3.65	(8.07; 22.37)	5.08	1.30	(2.54; 7.63)
λ	-0.31	0.34	(-0.97; 0.35)	-4.96	1.51	(-7.92; -2.00)
A	28.57	0.48	(27.64; 29.50)	41.18	2.17	(36.93; 45.43)
<i>C1R2</i>	<i>Hoja 1</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0018$	<i>Ajust: Gompertz</i>	<i>Hoja 2</i>	$\hat{\sigma}^2:0.853$	<i>Ajust: Gompertz</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	18.49	0.24	(18.01; 18.97)	13.58	3.02	(7.66; 19.50)
λ	-0.32	0.022	(-0.36; -0.27)	-1.43	0.57	(-2.55; 0.31)
A	47.83	0.07	(47.69; 47.97)	45.25	1.20	(42.90; 47.61)

En la tabla 14 se muestra las características mencionadas anteriormente para las hojas sometidas a la concentración 2, por cada una de las réplicas y para cada hoja. Para los cuatro modelos se obtuvieron varianzas pequeñas lo que apoya que los modelos ajustados en el tratamiento con concentración 2 de metales pesados.

Tabla 14. Modelo Gompertz ajustado para *Colocasia esculenta* bajo concentración 2.

<i>C2R1</i>	<i>Hoja 1</i>	$\hat{\sigma}^2:0.8174$	<i>Ajust: Gompertz</i>	<i>Hoja 2</i>	$\hat{\sigma}^2:0.555$	<i>Ajust: Gompertz</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	23.99	1.58	(20.90; 27.09)	26.74	4.62	(17.69; 35.79)
λ	0.48	0.34	(0.36; 0.61)	-0.20	0.22	(-0.62; 0.23)
A	44.95	0.42	(44.13; 45.78)	44.55	0.52	(43.52; 45.58)
<i>C2R2</i>	<i>Hoja 1</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0657$	<i>Ajust: Gompertz</i>	<i>Hoja 2</i>	$\hat{\sigma}^2:0.1022$	<i>Ajust: Gompertz</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	14.61	1.03	(12.59; 16.62)	18.67	0.81	(17.08; 20.26)
λ	-1.40	0.18	(-1.75; -1.05)	-0.93	0.09	(-1.11; -0.74)
A	42.38	0.20	(41.98; 42.78)	53.41	0.20	(53.01; 53.81)

En la figura 15 se observan las curvas ajustadas del modelo de crecimiento Gompertz. Para el tratamiento sin concentración de metales pesados en la réplica 2 hoja 2 se obtuvo la mayor tasa de crecimiento de 30.41 cm y la más baja fue de 23 cm aproximadamente para la misma réplica (2) en la hoja 1. En la concentración 1 de metales pesados la mayor tasa de crecimiento fue de 18.49 cm dada para la réplica 2 hoja 1 y para la concentración 2 de metales pesados fue una tasa de 26.74 cm. Se observa una tendencia en las tasas de crecimiento donde el tratamiento control (sin concentración de metales pesados) y la

concentración 2 son similares, aunque se observa mejor crecimiento en el tratamiento control.

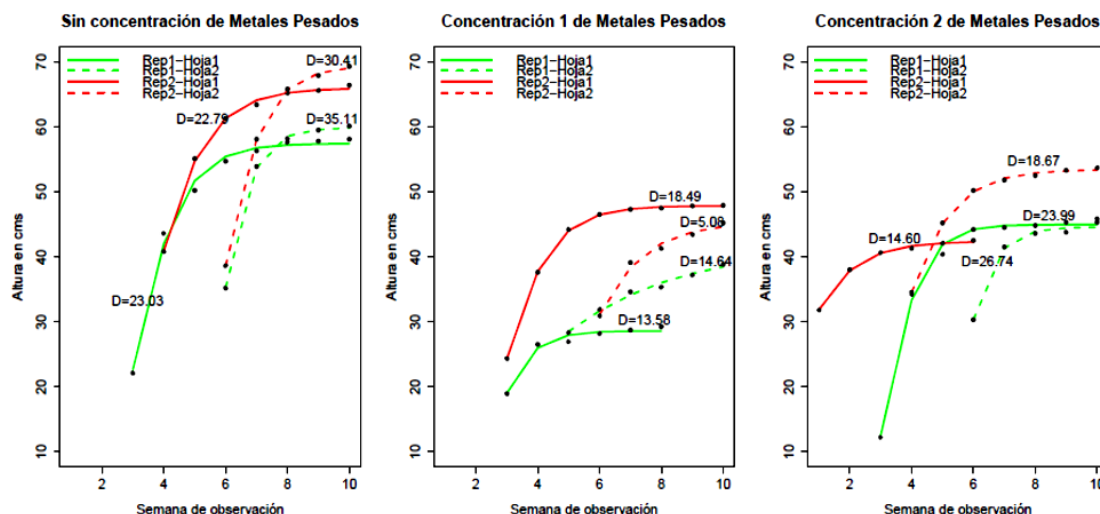


Figura 15. Curvas de crecimiento del modelo Gompertz para *Colocasia esculenta*. Sin concentración de metales: control.

8.3.2. *Heliconia psittacorum* (Heliconia). Longitud Total.

Para la especie *Heliconia psittacorum* el modelo de crecimiento que mejor ajuste obtuvo a los datos fue el modelo Logístico de 3 parámetros.

En la tabla 15 se muestra los resultados del ajuste del modelo Logístico para las hojas sometidas a la concentración sin metales pesados ni contaminantes, por cada una de las réplicas y para cada hoja.

Para los cuatro modelos se obtuvieron varianzas pequeñas lo que apoya que los modelos ajustados en el tratamiento control son adecuados. Respecto a la tasa de retraso λ (fase inicial) son adecuadas para el ajuste del modelo a los datos, ya que al ser negativos permite que la curva se ajuste en los valores observados y con relación a la asíntota A , donde se estabiliza el crecimiento algunas tendrán mayor asíntota que otras ya que son más jóvenes.

Comportamientos similares se presentan para los casos de las plantas que fueron sometidas a las concentraciones 1 y 2 de metales pesados como puede observarse en las tablas 16 y 17 respectivamente.

Tabla 15. Modelo Logístico ajustado para *Heliconia psittacorum* sin concentración.

<i>CTR1</i>	<i>Hoja 1</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0039$	<i>Ajust: Logístico</i>	<i>Hoja 2</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0118$	<i>Ajust: Logístico</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	0.38	0.11	(0.174; 0.602)	0.45	0.22	(0.020; 0.886)
λ	-48.18	12.54	(-72.76; -23.60)	-40.07	18.18	(-75.71; -4.43)
A	23.84	1.93	(-23.60; 27.62)	20.76	1.64	(17.54; 23.98)
<i>CTR2</i>	<i>Hoja 1</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0033$	<i>Ajust: Logístico</i>	<i>Hoja 2</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0041$	<i>Ajust: Logístico</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	0.34	0.10	(0.142; 0.554)	0.37	0.09	(0.197; 0.554)
λ	-55.73	15.48	(-86.09; -25.38)	-37.92	8.70	(-54.99; -20.86)
A	25.33	2.61	(20.20; 30.46)	18.65	1.29	(16.11; 21.20)

Tabla 16. Modelo Logístico ajustado para *Heliconia psittacorum* bajo concentración 1.

<i>C1R1</i>	<i>Hoja 1</i>	$\hat{\sigma}^2: 0.0066$	<i>Ajust: Logístico</i>	<i>Hoja 2</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0019$	<i>Ajust: Logístico</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	0.285	0.16	(-0.035; 0.606)	0.288	0.078	(0.135; 0.441)
λ	-54.52	28.99	(-111.36; 2.30)	-67.75	16.91	(-100.91; -34.60)
A	21.68	5.88	(10.14; 33.21)	27.59	3.93	(19.88; 35.29)
<i>C1R2</i>	<i>Hoja 1</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0054$	<i>Ajust: Logístico</i>	<i>Hoja 2</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0021$	<i>Ajust: Logístico</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	0.598	0.15	(0.29; 0.90)	0.43	0.15	(0.134; 0.726)
λ	-37.20	8.94	(-54.72; -19.68)	-74.20	-17.16	(-2.55; -0.31)
A	24.83	0.88	(23.09; 26.57)	23.29	1.81	(19.75; 26.84)

Tabla 17. Modelo Logístico ajustado para *Heliconia psittacorum* bajo concentración 2.

<i>C2R1</i>	<i>Hoja 1</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0078$	<i>Ajust: Logístico</i>	<i>Hoja 2</i>	$\hat{\sigma}^2: 0.0394$	<i>Ajust: Logístico</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	0.821	0.20	(0.428; 1.212)	1.41	0.36	(0.694; 2.130)
λ	-24.30	5.81	(-35.69; -12.90)	-14.58	3.99	(-22.42; -6.75)
A	20.61	0.36	(19.89; 21.32)	22.60	0.35	(21.90; 23.30)
<i>C2R2</i>	<i>Hoja 1</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0255$	<i>Ajust: Logístico</i>	<i>Hoja 2</i>	$\hat{\sigma}^2:0.0074$	<i>Ajust: Logístico</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	1.33	0.26	(12.59; 16.62)	1.134	0.15	(0.846; 1.422)
λ	-11.68	2.54	(-1.75; -1.05)	-0.93	0.09	(-16.67; -6.69)
A	18.00	0.21	(41.98; 42.78)	53.41	0.20	(17.58; 18.42)

En la figura 16 se observan las curvas ajustadas del modelo de crecimiento Logístico. Para el tratamiento sin concentración de metales pesados en la réplica 1 hoja 2 se obtuvo la mayor tasa de crecimiento de 0.453 cm y la más baja fue de aproximadamente 0.35 cm para la misma réplica (2) en la hoja 1. En la concentración 1 de metales pesados la mayor tasa de crecimiento fue de 0.59 cm dada para la réplica 1 hoja 1 y para la concentración 2 de metales pesados fue una tasa de crecimiento de 1.412 cm en la réplica 1 hoja 2. Se observa que las tasas de crecimiento máximas en la concentración 2 de metales pesados fueron

superiores a los otros dos tratamientos, para la concentración 1 de metales pesados y el tratamiento sin carga contaminante las tasas de crecimientos fueron similares.

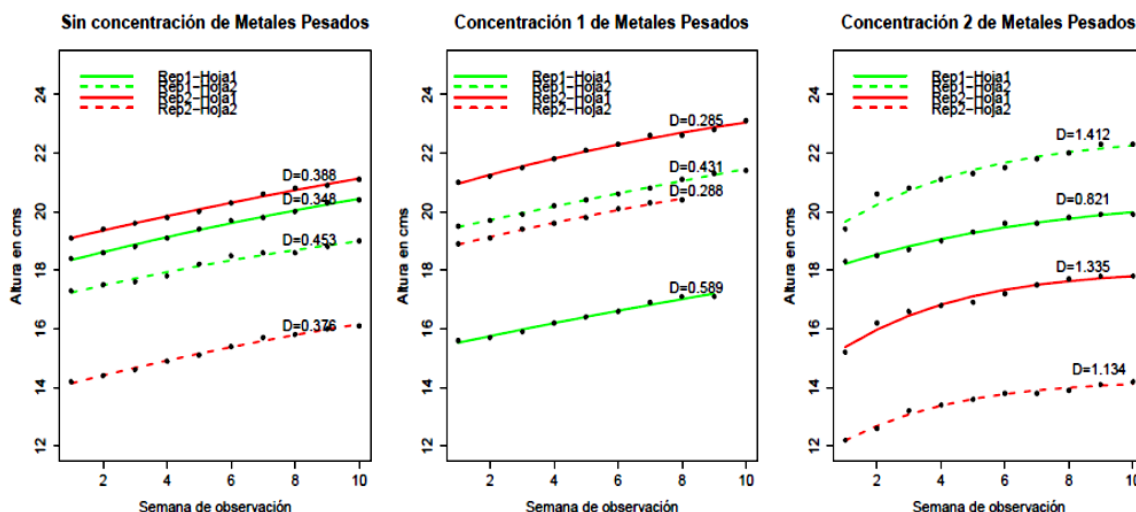


Figura 16. Curvas de crecimiento del modelo Logístico para *Heliconia psittacorum*. Sin concentración de metales: control.

Los trabajos de biorremediación en heliconia muestran que es una especie hiperacumuladora de metales pesados y por ende tiene un potencial para descontaminación ambiental, ya que en estudios como los realizados por Aulestia, 2012, esta especie puede estar expuesta a lixiviados de rellenos sanitario sin ser afectada por el contenido de contaminantes presente en este residuo. Además *Heliconia psittacorum* ha sido evaluado en el sistema de humedales artificiales por (Fu, C. *et al.*, 2005; Wu, J. *et al.*, 2006a; Wu, J. *et al.*, 2006b; Calheiros, C.S.C. *et al.*, 2007; Zhang, Z. *et al.*, 2007 y Konnerup, D. *et al.* en el 2009 citado por Fuentes 2011) donde se encontraron resultados satisfactorios.

8.3.3. *Gynerium sagittatum* (Caña Brava). Longitud Total.

Para la especie *Gynerium sagittatum* el modelo de crecimiento que mejor ajuste obtuvo a los datos fue el modelo Logístico de 3 parámetros.

En la tabla 18 se muestra los resultados del ajuste del modelo Logístico para las hojas sometidas a la concentración sin metales pesados ni contaminantes, por cada una de las dos réplicas.

Para los 2 modelos ajustados a las plantas sometidas al tratamiento control se obtuvieron varianzas un poco mayor (superiores a uno) con respecto a las de las concentraciones 1 y 2 de metales pesados, aun así, es pequeña y puede considerarse la adecuación del modelo.

Respecto a la tasa de la fase inicial o de retraso λ los valores son adecuados para el ajuste del modelo a los datos, ya que al ser negativos permite que la curva se ajuste a los valores observados y con relación a la asíntota A donde se estabiliza el crecimiento, algunas tendrán mayor asíntota que otras por su edad.

Comportamientos muy similares se presentan para los casos de las plantas que fueron sometidas a las concentraciones 1 y 2 de metales pesados como puede observarse en las tablas 19 y 20 respectivamente.

Tabla 18. Modelo Logístico ajustado para *Gynerium sagittatum* sin concentración.

<i>CT</i>	<i>Replica 1</i>	$\hat{\sigma}^2: 1.97$	<i>Ajust: Logístico</i>	<i>Replica 2</i>	$\hat{\sigma}^2: 1.983$	<i>Ajust: Logístico</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	2.748	0.263	(2.23; 3.26)	2.19	0.196	(1.801; 2.579)
λ	-3.24	0.718	(-4.65; -1.83)	-3.35	0.706	(-4.736; -1.967)
A	42.50	6.30	(-23.60; 27.62)	36.08	6.454	(23.43; 48.73)

Tabla 19. Modelo Logístico ajustado para *Gynerium sagittatum* bajo concentración 1.

<i>C1</i>	<i>Replica 1</i>	$\hat{\sigma}^2: 0.3427$	<i>Ajust: Logístico</i>	<i>Replica 2</i>	$\hat{\sigma}^2: 0.3668$	<i>Ajust: Logístico</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	5.41	0.371	(4.67; 6.13)	1.79	0.639	(0.539; 3.046)
λ	-3.14	0.355	(-3.83; -2.44)	-17.34	6.448	(-29.98; -4.71)
A	40.54	0.406	(39.74; 41.34)	40.85	2.381	(36.18; 45.52)

Tabla 20. Modelo Logístico ajustado para *Gynerium sagittatum* bajo concentración 2.

<i>CT</i>	<i>Replica 1</i>	$\hat{\sigma}^2: 0.3262$	<i>Ajust: Logístico</i>	<i>Replica 2</i>	$\hat{\sigma}^2: 0.0069$	<i>Ajust: Logístico</i>
Parámetro	Estimación	Error est.	IC 95 %	Estimación	Error est.	IC 95 %
D	1.235	0.695	(-0.127; 2.597)	0.804	0.263	(0.286; 1.321)
λ	-34.34	18.64	(-70.88; 2.19)	-33.00	10.26	(-53.11; -12.89)
A	58.139	10.95	(36.66; 79.61)	25.51	0.533	(24.47; 26.56)

En la figura 17 se observa el comportamiento de la curva ajustada a través del modelo Logístico. Para el tratamiento sin concentración de metales se tuvo que la mayor tasa máxima de crecimiento fue de 2.75 cm para la réplica 1; en las plantas bajo la concentración 1 se obtuvo una concentración de 5.4 cm (réplica 1) y la réplica 2 de 1.79 cm

y en la concentración 2 de metales pesados se lograron tasas de crecimiento de 1.24 cm y 0.804, réplica 1 y 2 respectivamente. De esta manera es posible observar que entre los tres tratamientos las tasas difieren entre réplicas y tratamientos, donde la concentración 2 fue la que presento menor crecimiento.

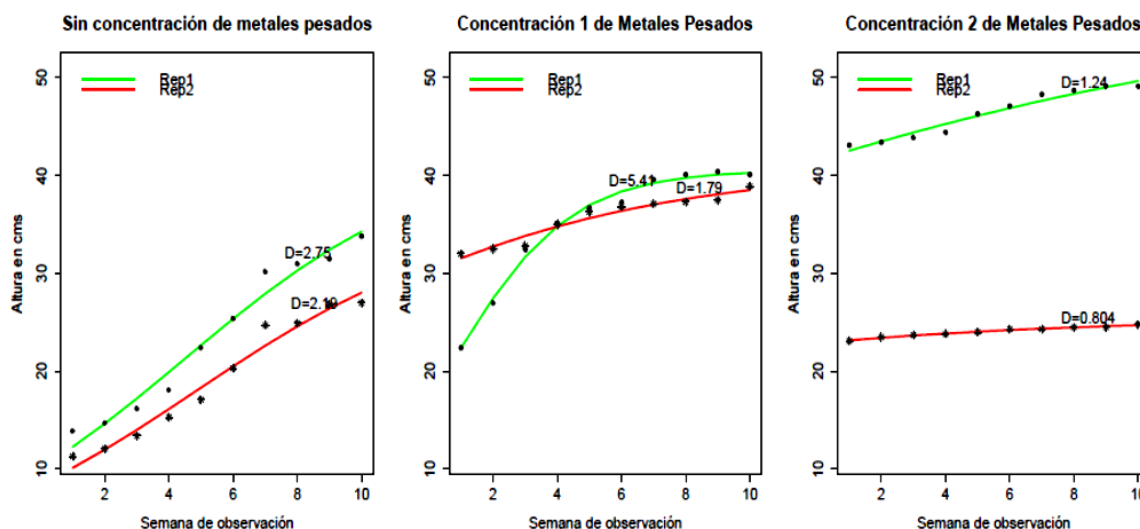


Figura 17. Curvas de crecimiento del modelo Logístico de *Gynerium sagittatum*. Sin concentración de metales: control.

Las variables de crecimiento en *Gynerium sagittatum*, muestran que todas las plantas sobrevivieron a la carga contaminante y además crecieron, esto se debe a que esta especie se caracteriza por crecer a las orillas de los ríos y que soporta un estrés prolongado de contaminantes ya que vive a la rivera del Rio Meléndez (Cali) que presenta contaminantes, además tiene una buena adaptabilidad al riego con lixiviados como se evidencio en el estudio de Torres & Vázquez 2010.

8.4. Análisis de Varianza para las tasas de crecimiento máximas

A continuación se presentan los resultados del análisis de varianza donde se lograron determinar si existían o no diferencias estadísticamente significativas en las tasas de crecimiento máximas de las longitudes totales entre los tres tratamientos, para cada una de las especies vegetales.

8.4.1. *Colocasia esculenta* (Oreja de burro)

Tabla 21. ANOVA de las tasas de crecimiento de *Colocasia esculenta*.

	GL	SC ajust.	MC ajust.	F	Pr(>F)
Concentración	2	435.46	217.73	7.30	0.025
Hoja(Concentración)	3	115.26	38.42	1.29	0.361
Error	6	178.84	29.81		
Total	11	729.5			

La tabla 21 muestra los resultados del ANOVA donde se obtuvo un valor-p de 0.025 para los efectos entre concentraciones (tratamientos) sobre las tasa de crecimiento máximas, por lo que se rechaza la hipótesis nula, que el efectos de las concentraciones de metal pesado y el tratamiento control sobre el crecimiento del tallo en la especie vegetal *Colocasia esculenta* fueron iguales.

Se corrobora a través de la prueba de hipótesis de Dunnett (tabla 22) que para las tasas de crecimiento máxima de la concentración 2 de metales pesados (C2) y el control (sin concentración de metales) no presentan diferencias significativas, pero caso contrario sucede con respecto a la concentración 1 de metales pesados (C1), donde se rechaza la hipótesis de igualdad (nula), es decir que, la C1 de metales pesados está generando una menor tasa de crecimiento máxima que el tratamiento control, por lo que las plantas expuestas a la C1 crecieron menos que las plantas control y las sometidas a la C2.

Tabla 22. Pruebas simultáneas de Dunnett en *Colocasia esculenta*.

Concentración	Dif. de medias	E.S de diferencia	Valor T	Valor P
C1	-14.74	3.861	-3.819	0.0156
C2	-6.83	3.861	-1.770	0.2107

Colocasia esculenta presento mayor crecimiento en la concentración alta de metales pesados, resultado similar se obtuvo en el estudio de Cheng et al (2009) donde *Cyperus flabelliformis*, *Vetiveria zizanioides*, *Phragmites australis* y *Acorus calamus* presentaron mayores índices de crecimiento a mayor tasa de eliminación del metales, es decir que el

efecto de crecimiento de las plantas en la eliminación de contaminantes de aguas residuales en humedales construidos, fue específicamente diferente por la carga contaminante.

Los resultados de Cheng *et al* (2009), sugieren que el efecto de crecimiento de las plantas en la eliminación de contaminantes en humedales fue directamente proporcional ya que las plantas con mayores índices de crecimiento, presentaban las más altas tasas de remoción de contaminante. En este estudio los resultados de la bioacumulación y translocación confirman que *Colocasia esculenta* y *Heliconia psittacorum* logro remover y bioacumular concentraciones altas de los metales y su crecimiento fue mayor en la concentración 2 de metales que en las concentración 1 de metales pesados. Otra investigación que apoya estos resultados es la realizada por Singh & Sinha, 2004 donde la longitud del tallo de *Helianthus annuus* aumentó con el aumento del tiempo en la corrección de los lodos, concluyendo que los lodos de curtiduría (altamente contaminados con metales pesados) aportan al crecimiento de la planta.

8.4.2. *Heliconia psittacorum* (Heliconia)

La tabla 23 muestra los resultados del ANOVA donde se obtuvo un valor-p de 0.002 para los efectos entre concentraciones (tratamientos) sobre las tasa de crecimiento máximas, por lo que se rechaza la hipótesis nula, la cual indica que los efectos de las concentraciones de metal pesado y el tratamiento control sobre la longitud total de la planta en la especie vegetal *Heliconia psittacorum* fueron iguales.

Tabla 23. ANOVA de las tasas de crecimiento de *Heliconia psittacorum*.

	GL	SC ajust.	MC ajust.	F	Pr(>F)
Concentración	2	1,627	0,813	21,16	0,002
Hoja(Concentración)	3	0,047	0,015	0,42	0,748
Error	6	0,230	0,0384		
Total	11	1,906			

A través de las pruebas de hipótesis de Dunnet (tabla 24) se confirma que para la concentración 1 de metales pesados y el control (sin concentración de metales) no hay diferencias estadísticamente significativas. Caso contrario sucede con respecto a la concentración 2 de metales pesados (C2), donde se rechaza la hipótesis de igualdad (nula),

es decir que, la C2 de metales pesados está generando una mayor tasa de crecimiento máxima que el tratamiento control.

Tabla 24. Pruebas simultáneas de Dunnett en *Heliconia psittacorum*.

Concentración	Dif. de medias	E.S de diferencia	Valor T	Valor P
C1	0.0152	0.1387	0.1100	0.9912
C2	0.7887	0.1387	5.6887	0.0023

En el estudios de Shukla *et al.* (2011) se observó que las especies *Terminalia arjuna*, *Prosopis juliflora*, *Populus alba*, *Eucalyptus tereticornis* y *Dendrocalamus strictus* presentaron tasas de crecimiento y capacidad de acumulación de metales altas. Lo cual es acorde con el comportamiento que presentaron las plantas de *Heliconia psittacorum*, las cuales presentaron tasas de crecimiento mayores en concentraciones altas de metales pesados, al parecer la tolerancia y/o resistencia al estrés metálico y la alta capacidad para la absorción de metales podría estar asociada a mayor número de sitios de absorción activos o sitios de unión a los metales. Este comportamiento de las especies es para tener un adecuado equilibrio entre las capacidades de productividad y remediación. (Shukla *et al.* (2011)).

8.4.3. *Gynerium sagittatum* (Caña brava)

Los resultados del ANOVA presento un valor-p de 0.358, por lo que no se rechaza la hipótesis nula, lo cual indica que el lixiviado contaminante al cual fueron sometidas las plantas no haya generado algún tipo de efecto sobre el desarrollo normal del tallo, en este caso indicador de la longitud total en *Gynerium sagittatum*.

Tabla 25. ANOVA de las tasas de crecimiento de *Gynerium sagittatum*.

	GL	SC ajust.	MC ajust.	F	Pr(>F)
Concentración	2	6,69	3,35	1,48	0,358
Error	3	6,80	2,27		
Total	5	13,49			

Según Kearney & Zhu, (2012) las plantas de los humedales expuestas a cargas de metales pesados y NO_3^- como *Glyceria grandis*, *Typha latifolia* y *Sagittaria latifolia* no inhiben su crecimiento, crecen bien en las condiciones de uno o varios contaminantes, lo cual también se observó en el caso *Gynerium sagittatum* donde los tratamientos con lixiviados y metales

pesados no tuvieron ningún efecto negativo en el crecimiento de las plantas, posiblemente la capacidad de tolerancia a los metales pesados a través de la exclusión o las estrategias de acumulación y aprovechamiento de los nutrientes de la carga orgánica de los lixiviados fue lo que permitió que las plantas crecieran normalmente.

La toxicidad de los metales pesados (MP) se manifiesta de muchas maneras cuando se acumulan en las células vegetales a concentraciones altas. La evidencia visual más notoria de la toxicidad de los MP es una reducción en el crecimiento de plantas incluyendo clorosis, necrosis, pérdida de turgencia, una disminución en la tasa de germinación de las semillas, y un aparato fotosintético paralizada, a menudo correlacionada con progresando procesos de senescencia o finalmente con la muerte de la planta, lo cual se observó en la experimentación que algunas plantas específicamente de *C. esculenta* aceleraba su proceso de senescencia pero se renovaba ya que rápidamente salía una nueva hoja. Todos estos efectos están relacionados con cambios ultra estructurales, bioquímicos y moleculares en los tejidos vegetales. Además, la asimilación de nitrógeno se reduce en respuesta a los MP y debido a esto ocurre la inhibición en las actividades de nitrato reductasa, nitrito reductasa, y la glutamina sintetasa. (Hossain *et al* 2012). Pero las plantas tienen mecanismos para tolerar esta carga contaminante que les permite seguir su desarrollo y crecimiento, la activación de la maquinaria antioxidante puede ayudar a las plantas para superar la tensión y el stress por los MP. (Hossain *et al* 2012). Lo cual posiblemente realizaron las especies vegetales estudiadas. Efecto similar se observa en *Arundo donax* registrado por Kausar *et al.* (2012), donde las plantas de esta especie toleraron la carga del metal contaminante sin afectar su crecimiento negativamente, al parecer la tolerancia establecida fue por una interrelación de los mecanismos fisiológicos y moleculares. Además de la producción de fitoquelatinas para inmovilizar los metales pesados.

Tabla 26. Principales resultados de estudios afines con la investigación actual.

Especies	Tipo de contaminante	Respuesta de crecimiento	Sistema	Referencia
<i>Glyceria grandis</i> , <i>Typha latifolia</i> y <i>Sagittaria latifolia</i>	Aguas residuales con tres tratamientos: N: NO_3^- , M: mezcla de metales pesado (Zn, Cd, Pb, Cu), y MN: Mezcla de metales + NO_3^- .	No tuvo ningún efecto negativo en el crecimiento de las plantas.	Humedal urbano	Kearney & Zhu, 2012
<i>Carex elata</i> , <i>Juncus effusus</i> , <i>Phalaris arundinacea</i> , <i>Phragmites australis</i> , y <i>Typha latifolia</i> .	Agua residual sintética con: NO_3^- y NH_4^+ concentraciones desde 100 hasta 200 ppm.	Todas las especies crecieron regularmente.	Humedal construido escala mesocosmos	Borin & Salvato, 2012.
<i>Arundo donax</i>	Cromo	Crecimiento normal	Cultivo hidropónico	Kausar <i>et al.</i> 2012.
<i>Terminalia arjuna</i> , <i>Prosopis juliflora</i> , <i>Populus alba</i> , <i>Eucalyptus tereticornis</i> y <i>Dendrocalamus strictus</i> .	Vertederos de lodos de curtiduría planta común de tratamiento de efluentes (CETP).	La tasa de crecimiento y capacidad de acumulación de metales fue alta y aumenta con el pasar del tiempo.	Lodos	Shukla <i>et al.</i> 2011.
<i>Helianthus annuus</i>	Suelo con diferentes cantidades de lodos de curtiembres extraídos de Aguas Residuales.	La longitud del tallo de la planta aumentó con el aumento de la proporción de la corrección de los lodos.	Lodos	Singh & Sinha, 2004.
<i>Cyperus flabelliformis</i> , <i>Vetiveria zizanioides</i> , <i>Phragmites australis</i> y <i>Acorus calamus</i> .	Aguas residuales domésticas.	A mayor índices de crecimiento mayor tasa de eliminación del metal.	Humedales construidos	Cheng <i>et al</i> 2009:
<i>Leucaena leucocephala</i>	Aguas residuales.	A mayor concentración del agua residual mayor tasa de crecimiento.	Tierra o suelo.	Mantilla & Rivas 1997.

8.5 Área foliar.

Los resultados de las aéreas de las hojas en *Heliconia* mostraron que no hubo efecto de los tratamientos, su crecimiento fue igual durante fase experimental, no hubo incremento significativo o perceptible. (Figura 18).

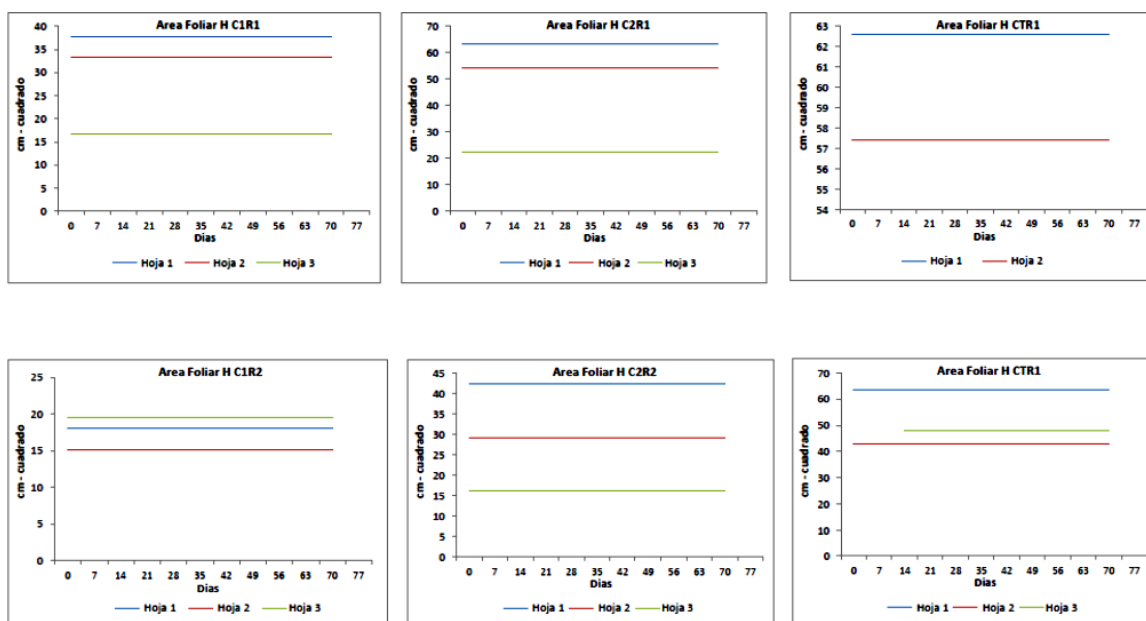


Figura 18. Área foliar de *Heliconia psittacorum*, en los 6 reactores durante el tratamiento. C1: Concentración 1 de metales pesados, C2: Concentración 2 de metales pesados, CT: control, sin concentración de metales, R1: réplica 1, R2: réplica 2.

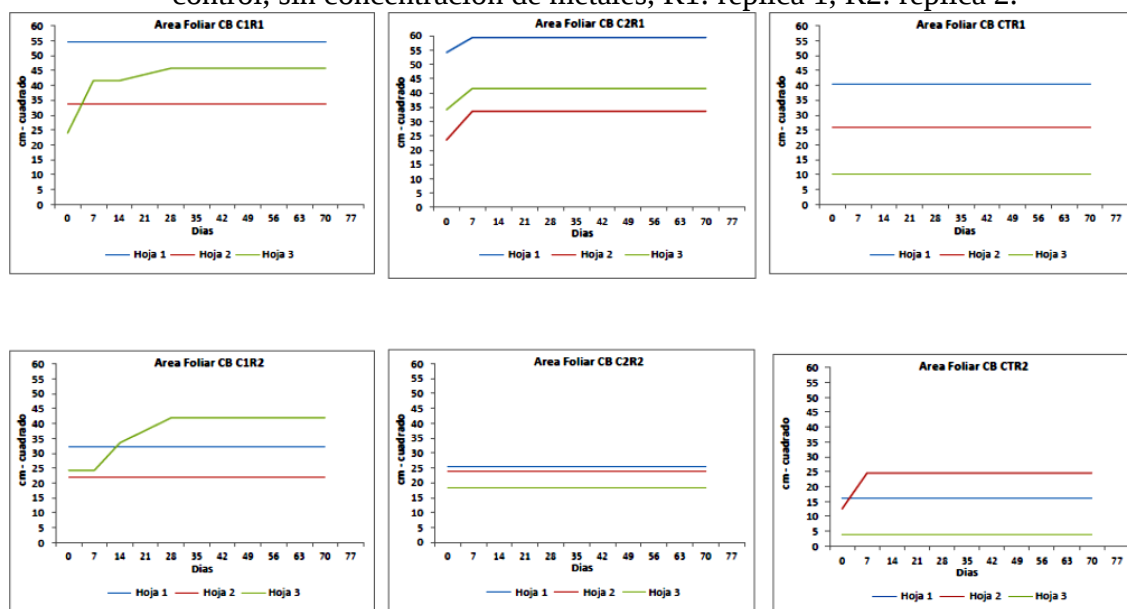


Figura 19. Área foliar de caña brava, *Gynerium sagittatum*, en los 6 reactores durante el tratamiento. C1: Concentración 1 de metales pesados, C2: Concentración 2 de metales pesados, CT: control, sin concentración de metales, R1: réplica 1, R2: réplica 2.

En la figura 19 se observa que para caña brava las hojas más jóvenes y pequeñas (Hoja 3) presentaron incremento en sus aéreas foliares en diferentes días como se observa en la C1R1 y C1R2, en las demás no hubo incremento en el tamaño de las hojas.

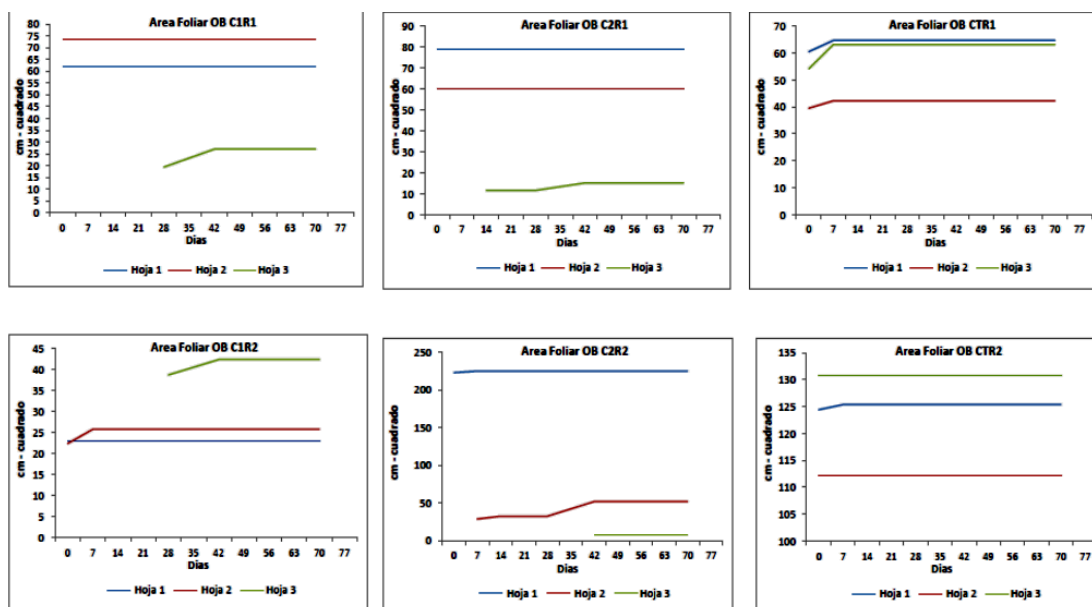


Figura 20. Área foliar de Oreja de Burro, *Colocasia esculenta*, en los 6 reactores durante el tratamiento. C1: Concentración 1 de metales pesados, C2: Concentración 2 de metales pesados, CT: control, sin concentración de metales, R1: réplica 1, R2: réplica 2.

Para oreja de burro las hojas más jóvenes (Hoja 2 y 3) presentaron incremento en sus aéreas foliares pero generalmente en los primeros días de existencia, las demás no aumentaron su tamaño (Figura 20).

Según Wiedenhoelft 2006, las hojas son el órgano de la planta donde principalmente se da el aprovechamiento del nitrógeno, el cual es un macro nutriente que juega un rol importante en la estructura de la clorofila, componente esencial en el proceso de fotosíntesis y que como consecuencia está directamente implicado en la formación de biomasa. (Pérez & García, 2004), pero en este caso las plantas no presentaron mayor cambio en sus aéreas foliares, fueron muy estables posiblemente en los intervalos de tiempo que se observó un leve incremento en el área foliar las plantas lograron aprovechar el nitrógeno presente en el lixiviado.

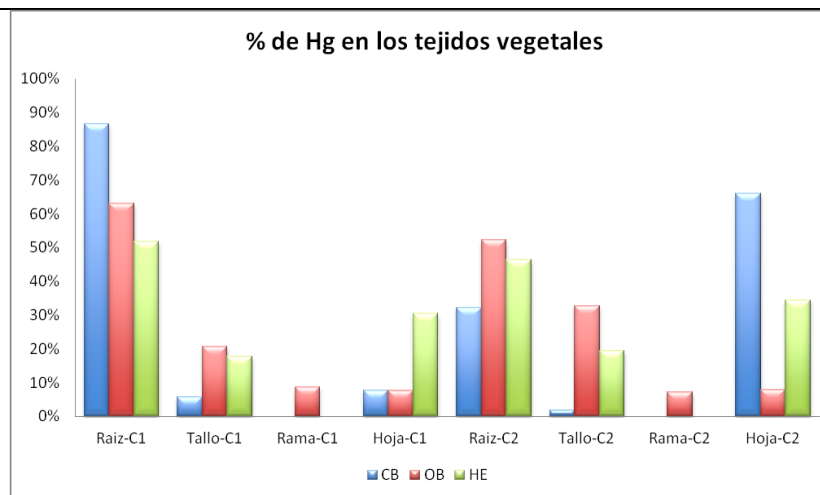
El tallo provee soporte mecánico a las hojas, flores y frutos, facilita la conducción del agua y nutrientes minerales desde las raíces a las hojas, además que está encargado de producción de tejidos vivos y almacenamiento. Las hojas por su parte cumplen la función de realizar el proceso de fotosíntesis, ya que por su forma presenta la máxima superficie con el mínimo volumen. (Valla, 1979 citado por Torres & Vázquez 2010, en ninguna de las tres especies dejó de crecer el tallo, pero su área foliar no creció significativamente, si el tallo disminuye la velocidad de crecimiento es decir no crece significativamente en el tiempo no afecta el desarrollo de sus funciones, pero si disminuye la velocidad del crecimiento del área foliar ya que si aumenta el área, disminuiría la capacidad fotosintética de la planta, lo cual afectaría la eficiencia de estas especies. (Torres & Vázquez 2010). A medida que se incrementa el área foliar aumenta el porcentaje de nitrógeno en las hojas disminuyendo conforme la planta madura, es decir que el estancamiento en el aumento del área foliar de las plantas estudiadas pudo ser por que las hojas llegaron a su madurez. (Peréz & García, 2004).

8.6 Metales pesados en los tejidos vegetales.

Los metales pesados en los tejidos de las plantas tendieron a acumularse en la raíz más que en cualquier otro órgano, y respecto a las especies vegetales la concentración de mercurio en las especies vegetales se presentaron una preferencia a la acumularon del metal en este orden: raíz > hoja > tallo, esto coincide con los resultados obtenidos por Skinner *et al.*, (2007) donde el mercurio se acumuló en la raíz de esta especie vegetal, aunque lo que se encontró en la R1 (réplica 1) de la concentración 2 de metales pesados para *Colocasia esculenta*, fue que en la rama se concentra casi la misma proporción que en la hoja y se observa mayor concentración de mercurio en el tallo que en los otros tejidos vegetales. En el caso de *Gynerium sagittatum* en la R1 (réplica 1) de la concentración 2 de metales, se observó que la que el 84,88% del mercurio se acumuló en la hoja. (Tabla 27 y Figura 21). En cuanto a la concentración de mercurio en las especies vegetales se observa que tanto para la concentración 1 de metales pesados y como para la concentración 2 de metales pesados es *Colocasia esculenta* > *Gynerium sagittatum* > *Heliconia psittacorum*.

Tabla 27. Concentración y porcentajes de mercurio (Hg) en los tejidos vegetales.

Mercurio (Hg) en los tejidos vegetales			Concentración de Hg en mg/kg					Porcentaje de Hg			
Carga de metales	Especie vegetal		Raíz	Tallo	Rama	Hoja	Total	Raíz	Tallo	Rama	Hoja
Concentración 1 de metales pesados	<i>Gynerium sagittatum</i>	R1	0,66	0,07	0	0,08	0,82	81,18%	8,96%	0%	9,86%
		R2	2,29	0,06	0	0,13	2,48	92,13%	2,52%	0%	5,35%
	<i>Heliconia psittacorum</i>	R1	0,25	0,14	0	0,13	0,52	47,58%	26,49%	0%	25,93%
		R2	0,51	0,08	0	0,32	0,91	55,99%	8,84%	0%	35,17%
	<i>Colocasia esculenta</i>	R1	1,14	0,52	0,20	0,15	2,01	56,75%	25,90%	10,12%	7,22%
		R2	2,59	0,57	0,27	0,29	3,73	69,46%	15,41%	7,25%	7,89%
Concentración 2 de metales pesados	<i>Gynerium sagittatum</i>	R1	0,42	0,08	0	2,79	3,29	12,73%	2,39%	0%	84,88%
		R2	3,05	0,08	0	2,79	5,92	51,58%	1,27%	0%	47,15%
	<i>Heliconia psittacorum</i>	R1	0,46	0,19	0	0,32	0,97	47,13%	19,74%	0%	33,13%
		R2	0,78	0,32	0	0,60	1,71	45,56%	19,01%	0%	35,43%
	<i>Colocasia esculenta</i>	R1	2,44	2,93	0,28	0,48	6,12	39,80%	47,88%	4,54%	7,78%
		R2	2,75	0,75	0,42	0,33	4,25	64,70%	17,65%	9,84%	7,80%

**Figura 21.** Porcentaje de mercurio (Hg +2) en los tejidos vegetales de las tres especies vegetales. CB: Caña Brava-*Gynerium sagittatum*, OB: Oreja de burro-*Colocasia esculenta* y HE: *Heliconia-Heliconia psittacorum*.

Para la concentración de cadmio (Cd^{+2}) en los tejidos vegetales se presentó una preferencia a la acumulación del metal en este orden: raíz > tallo > hoja, para *Colocasia esculenta* se observa mayor concentración de cadmio en la raíz para la concentración 1 de metales pesados valores entre el 56 al 77% y en la concentración 2 de metales pesados con valores cercanos al 80%. En las otras dos especies el 100% del metal se acumuló en la raíz (Tabla 28 y Figura 22). Para la concentración de cadmio en las especies vegetales se observa que

para la concentración 1 de metales pesados es *Colocasia esculenta* > *Gynerium sagittatum* > *Heliconia psittacorum* y para la concentración 2 de metales pesados es *Gynerium sagittatum* > *Colocasia esculenta* > *Heliconia psittacorum* aunque entre estas dos primeras especies no hay mucha diferencias ya que tienen en sus tejidos concentraciones promedio del cadmio es de 37,18 y 31,71 mg/kg respectivamente.

Tabla 28. Concentración y porcentajes de cadmio (Cd) en los tejidos vegetales.

Cadmio (Cd) en los tejidos vegetales			Concentración de Cd en mg/kg					Porcentaje de Cd			
Carga de metales	Especie vegetal		Raíz	Tallo	Rama	Hoja	Total	Raíz	Tallo	Rama	Hoja
Concentración 1 de metales pesados	<i>Gynerium sagittatum</i>	R1	11,22	1,73	0	1,46	14,42	77,84%	12,03%	0%	10,14%
		R2	5,73	2,61	0	1,89	10,24	56,01%	25,51%	0%	18,48%
	<i>Heliconia psittacorum</i>	R1	2,24	0	0	0	2,24	100%	0%	0%	0%
		R2	2,98	0	0	0	2,98	100%	0%	0%	0%
	<i>Colocasia esculenta</i>	R1	7,36	0	0	0	7,36	100%	0%	0%	0%
		R2	6,98	0	0	0	6,98	100%	0%	0%	0%
Concentración 2 de metales pesados	<i>Gynerium sagittatum</i>	R1	32,76	3,86	0	3,51	40,13	81,63%	9,61%	0%	8,75%
		R2	29,70	2,40	0	2,13	34,23	86,76%	7,01%	0%	6,22%
	<i>Heliconia psittacorum</i>	R1	3,42	0	0	0	3,42	100%	0%	0%	0%
		R2	6,42	0	0	0	6,42	100%	0%	0%	0%
	<i>Colocasia esculenta</i>	R1	20,07	0	0	0	20,07	100%	0%	0%	0%
		R2	11,64	0	0	0	11,64	100%	0%	0%	0%

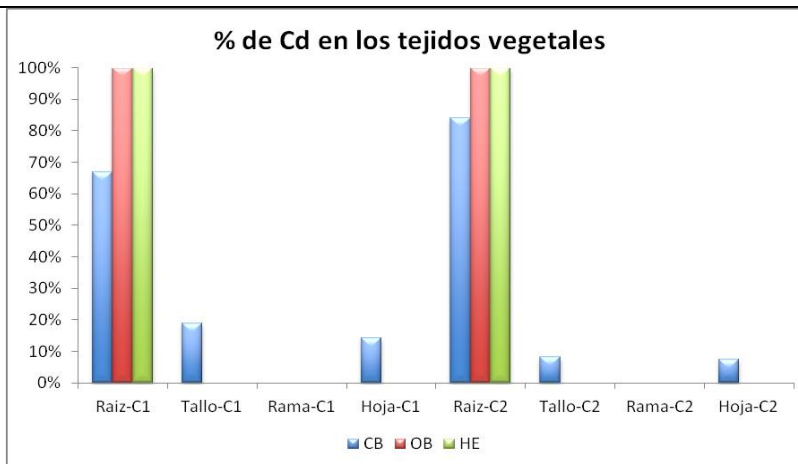


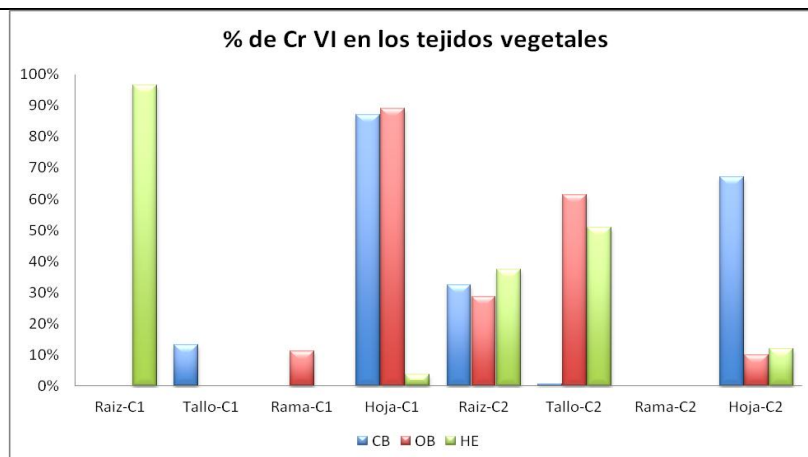
Figura 22. Porcentaje de Cadmio (Cd +2) en los tejidos vegetales de las tres especies vegetales. CB: Caña Brava-*Gynerium sagittatum*, OB: Oreja de burro-*Colocasia esculenta* y HE: *Heliconia psittacorum*.

El Cd es un metal tóxico y no es esencial, este metal afecta los procesos metabólicos y el crecimiento de las plantas a bajas concentraciones. Por ejemplo, la unión a los grupos sulfhidrilo de las proteínas estructurales y enzimas del Cd lleva a la inhibición de la actividad y / o interferencia en la regulación enzimática. Los efectos del Cd también se pueden ver en los embriones malformados de la planta de *Arabidopsis* expuestos a Cd (alta tasa de mutación). En las plantas superiores, la síntesis de etileno en cooperación con el ácido jasmónico (JA), puede aumentar la senescencia, inhibir el crecimiento celular y aumentar la rigidez de la pared celular por medio de lignificación como respuesta a este metal (Hossain *et al* 2012). Este metal generalmente se bioacumula en la raíz de la planta, no lo translocan, como se puede ver en la figura 36. Por lo tanto se puede suponer que las tres especies vegetales, principalmente *C. esculenta* tiene una capacidad de bioacumulación para el Cd. (Bonanno 2012).

La concentración de cromo VI en *Gynerium sagittatum* se presentó mayor acumulación del metal en este orden: hoja > tallo > raíz en la concentración 1 de metales pesados pero en la concentración 2 de metales pesados fue: hoja > raíz > tallo, para *Colocasia esculenta* para la concentración 1 de metales pesados se observa mayor concentración de cromo VI, en sus hojas y ramas, más del 70% del metal en las hojas y cero concentración en los otros tejidos vegetales, en la concentración 2 de metales pesados la réplica 1 (R1), solo acumuló en su tallo subterráneo 100%, la réplica 2 (R2) presentó la siguiente proporción: raíz > tallo > hoja. En el caso de *Heliconia psittacorum* en la R1 de la concentración 1 de metales pesados, se observó que la mayor concentración del metal se encontró en la raíz y en menor proporción en la hoja, en la R2 el 100% del cromo VI se acumuló en la raíz. (Tabla 29 y Figura 23). Las concentraciones del cromo VI en las especies vegetales se observa que tanto para la concentración 1 de metales pesados y como para la concentración 2 de metales pesados las especies vegetales presenta el siguiente orden: *Colocasia esculenta* > *Heliconia psittacorum* > *Gynerium sagittatum*. Pero para la concentración 2 de metales pesados, réplica 2 en *Colocasia esculenta* se observa una mayor concentración del cromo VI desde 3 a 100 veces más que en las otras especies y repeticiones ya que presenta valores de 100,49 mg/kg.

Tabla 29. Concentración y porcentajes de cromo (Cr +6) en los tejidos vegetales.

Cromo (Cr ⁺⁶) en los tejidos vegetales			Concentración de Cr VI en mg/kg					Porcentaje de Cr VI			
Carga de metales	Especie vegetal		Raíz	Tallo	Rama	Hoja	Total	Raíz	Tallo	Rama	Hoja
Concentración 1 de metales pesados	Gynerium sagittatum	R1	0	3,88	0,00	11,02	14,90	0%	26,04%	0%	73,96%
		R2	0	0	0	0,75	0,75	0%	0%	0%	100%
	Heliconia psittacorum	R1	33,44	0	0	2,54	35,98	92,94%	0%	0%	7,06%
		R2	1,94	0	0	0	1,94	100%	0%	0%	0%
	Colocasia esculenta	R1	0	0	0	4,69	4,69	0%	0%	0%	100%
		R2	0	0	5,33	18,81	24,14	0%	0%	22,06%	77,94%
Concentración 2 de metales pesados	Gynerium sagittatum	R1	0,47	0	0	0,81	1,28	36,72%	0%	0%	63,28%
		R2	4,00	0,16	0	10,18	14,34	27,89%	1,12%	0%	70,99%
	Heliconia psittacorum	R1	11,39	0,23	0	3,62	15,23	74,74%	1,49%	0%	23,76%
		R2	0	0,46	0	0	0,46	0%	100%	0%	0%
	Colocasia esculenta	R1	0	20,63	0	0	20,63	0%	100%	0%	0%
		R2	57,55	22,97	0	19,97	100,49	57,27%	22,86%	0%	19,88%

**Figura 23.** Porcentaje de cromo (Cr +6) en los tejidos vegetales de las tres especies vegetales. CB: Caña Brava-*Gynerium sagittatum*, OB: Oreja de burro-*Colocasia esculenta* y HE: *Heliconia-Heliconia psittacorum*.

En cuanto a la concentración del cromo total en *Gynerium sagittatum* se presentaron una preferencia a la acumularon del metal en el siguiente orden: raíz > hoja > tallo para los dos tratamientos, concentración 1 de metales pesados y concentración 2 de metales pesados, para *Colocasia esculenta* se observa mayor concentración de cromo total en raíz que en los otros tejidos vegetales, el tallo fue el segundo en presentar mayores concentraciones del metal, en las ramas y hojas se observan valores muy similares pero en pequeñas cantidades

del cromo total en estos tejidos, esto se observa para las dos cargas o tratamientos. En el caso de *Heliconia psittacorum* en la R1 (réplica 1) de la concentración 1 de metales pesados, se observó que el cromo total se acumuló en mayor proporción en el tallo más del 50%, en la raíz el 36% y la menor cantidad del metal en la hoja (12 %), para la réplica 2 (R2) de la concentración 1 y la concentración 2 de metales pesados se observa el mismo orden en la manera de acumulación para el cromo total de *Gynerium sagittatum*: raíz > hoja > tallo. (Tabla 30 y Figura 24). Para la concentración de cromo total en las especies vegetales se observa que para la concentración 1 de metales pesados es *Colocasia esculenta* > *Heliconia psittacorum* > *Gynerium sagittatum* y para la concentración 2 de metales pesados es *Gynerium sagittatum* > *Colocasia esculenta* > *Heliconia psittacorum* aunque entre estas dos primeras especies no hay mucha diferencias ya que tienen en sus tejidos concentraciones del cadmio de 184,46 y 132,08 mg/kg respectivamente.

Tabla 30. Concentración y porcentajes de cromo (Total) en los tejidos vegetales.

Cromo (Total) en los tejidos vegetales			Concentración de Cr Total en mg/kg					Porcentaje de Cr Total			
Carga de metales	Especie vegetal		Raíz	Tallo	Rama	Hoja	Total	Raíz	Tallo	Rama	Hoja
Concentración 1 de metales pesados	Gynerium sagittatum	R1	28,81	5,81	0	6,08	40,70	70,79%	14,27%	0%	14,94%
		R2	30,25	4,25	0	5,75	40,24	75,16%	10,56%	0%	14,28%
	Heliconia psittacorum	R1	16,76	23,80	0	5,58	46,14	36,33%	51,58%	0%	12,09%
		R2	40,95	8,79	0	16,02	65,76	62,27%	13,37%	0%	24,35%
	Colocasia esculenta	R1	67,52	13,41	4,71	3,74	89,38	75,54%	15,01%	5,27%	4,18%
		R2	153,9	68,40	4,07	21,83	248,20	62,00%	27,56%	1,64%	8,80%
Concentración 2 de metales pesados	Gynerium sagittatum	R1	118,8	5,53	0	10,61	134,96	88,04%	4,10%	0%	7,86%
		R2	226,2	3,11	0	8,66	237,96	95,05%	1,31%	0%	3,64%
	Heliconia psittacorum	R1	31,47	5,34	0	9,61	46,42	67,79%	11,51%	0%	20,70%
		R2	66,09	6,82	0	12,29	85,21	77,56%	8,01%	0%	14,43%
	Colocasia esculenta	R1	135,1	11,59	6,06	8,39	161,11	83,83%	7,20%	3,76%	5,21%
		R2	55,67	19,34	15,58	12,46	103,05	54,02%	18,77%	15,12%	12,09%

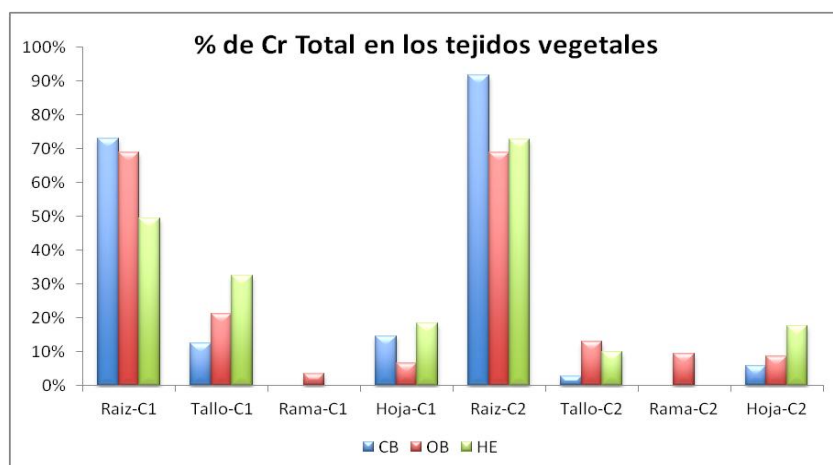


Figura 24. Porcentaje de Cromo Total (Cr Total) en los tejidos vegetales de las tres especies vegetales. CB: Caña Brava-*Gynerium sagittatum*, OB: Oreja de burro-*Colocasia esculenta* y HE: Heliconia-*Heliconia psittacorum*.

El Cr en bajas concentraciones puede estimular el crecimiento vegetal pero hay evidencias de la fitotoxicidad por exceso de este metal (Cr) en las plantas, principalmente puede causar la formación de proteínas que llegan a causar la interrupción del metabolismo N. para el estudio realizado por Bonanno 2012, la acumulación del Cr disminuía desde las raíces, tallos y hojas para la especie *Arundo donax* donde la raíz actúa como la principal fuente de bioacumulación. La concentración de Cr en las plantas depende principalmente de la fracción soluble en Cr de los suelos. Sin embargo, aunque la mayoría de los suelos contienen cantidades significativas de Cr, su disponibilidad para las plantas es muy limitada, al parecer porque los tejidos de raíz no son capaces de estimular la reducción de este metal. (Bonanno 2012).

La concentración de plomo (Pb^{+2}) en las especies vegetales se manifestaron en el caso de *Gynerium sagittatum* y *Heliconia psittacorum* con una preferencia a la acumulación del metal en este orden: raíz > hoja > tallo, aunque en la R1 (réplica 1) de la concentración 1 de metales pesados de *Heliconia psittacorum* no acumuló el Pb en el tallo, para *Colocasia esculenta* en la concentración 1 de metales pesados se observa mayor concentración de plomo en la raíz > tallo > hoja y para la R1 varía este orden ya que hay mayor contenido en rama que en la hoja (la raíz > tallo > rama > hoja), en la concentración 2 de metales pesados se observa algo atípico en la R1 la hoja presenta la mayor concentración de plomo

aproximadamente con el 50% de este metal que en los otros tejidos vegetales, en el caso de la R2 (réplica 2) la proporción del metal en los tejidos es: raíz > hoja > rama y 0% para tallo (Tabla 31 y Figura 25). Para la concentración de plomo en las especies vegetales se observa que para la concentración 1 de metales pesados el orden corresponden a *Colocasia esculenta* > *Gynerium sagittatum* > *Heliconia psittacorum* y para la concentración 2 de metales pesados *Colocasia esculenta* > *Gynerium sagittatum* > *Heliconia psittacorum*. La especie *Colocasia esculenta* presenta una muy buena acumulación de este metal en la concentración más alta, casi el doble que las otras dos especies.

Tabla 31. Concentración y porcentajes de plomo (Pb) en los tejidos vegetales.

Plomo (Pb) en los tejidos vegetales		Concentración de Pb en mg/kg						Porcentaje de Pb			
Carga de metales	Especie vegetal		Raíz	Tallo	Rama	Hoja	Total	Raíz	Tallo	Rama	Hoja
Concentración 1 de metales pesados	<i>Gynerium sagittatum</i>	R1	14,71	2,28	0	4,78	21,77	67,56%	10,49%	0%	21,95%
		R2	8,24	4,99	0	5,13	18,36	44,89%	27,16%	0%	27,95%
	<i>Heliconia psittacorum</i>	R1	4,15	0	0	2,54	6,69	62,08%	0%	0%	37,92%
		R2	8,32	2,58	0	6,17	17,07	48,74%	15,11%	0%	36,15%
	<i>Colocasia esculenta</i>	R1	15,40	5,26	2,20	1,98	24,83	62,01%	21,17%	8,86%	7,97%
		R2	9,89	9,19	0	5,30	24,38	40,57%	37,71%	0%	21,72%
	<i>Gynerium sagittatum</i>	R1	21,29	1,33	0	5,05	27,68	76,94%	4,82%	0%	18,24%
		R2	25,08	2,02	0	3,81	30,91	81,13%	6,53%	0%	12,34%
	<i>Heliconia psittacorum</i>	R1	8,47	2,03	0	4,62	15,12	56,04%	13,40%	0%	30,56%
		R2	15,99	1,83	0	6,27	24,09	66,38%	7,59%	0%	26,04%
Concentración 2 de metales pesados	<i>Colocasia esculenta</i>	R1	21,90	5,19	2,23	30,20	59,51	36,80%	8,72%	3,74%	50,74%
		R2	19,22	0	3,38	4,27	26,87	71,54%	0%	12,58%	15,89%

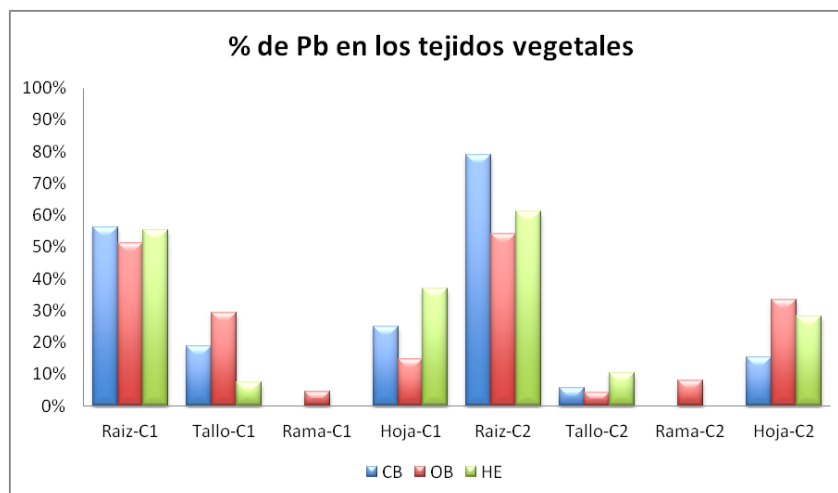


Figura 25. Porcentaje de Plomo (Pb) en los tejidos vegetales de las tres especies vegetales. CB: Caña Brava-*Gynerium sagittatum*, OB: Oreja de burro-*Colocasia esculenta* y HE: *Heliconia psittacorum*.

La comparación entre los tejidos morfológicos de las plantas mostró que las raíces en general presentaron mayores concentraciones de metales que en los tallos y hojas, sin embargo, no hay una tendencia coherente de acumulación de metales en los tallos más que en las hojas, ya que esto depende en gran medida de las especies individuales examinadas. (Cardwell *et al* 2002). Algunas plantas muestran una tendencia general en el contenido del metal que sigue el patrón de raíces > hojas > tallos, por lo que las raíces actúan como los principales centros de bioacumulación y los tallos como órganos de tránsito como consecuencia de la translocación general desde la raíz hasta las hojas. (Bonanno 2012). La mayoría de estudios indican que en las raíces se acumulan más metales que el rizoma (posiblemente debido a la placa de hierro), y las hojas se acumulan la menor cantidad de metales aunque en algunos casos la planta lo puede translocar a las hojas. (Cardwell *et al* 2002). Otros estudios demuestran que las paredes celulares de las raíces pueden ser lugares adecuados para la acumulación y por lo tanto puede ser la razón de la mayor concentración de los elementos metálicos en las raíces en comparación con otros órganos. (Bonanno 2012). El desplazamiento mayor de la raíz a las hojas que se derivan de la raíz puede depender de las vacuolas de las hojas que por lo general actúan como principales centros de

acumulación de metales en los órganos aéreos (Clemens et al., 2002 citado por Bonanno 2012).

La figura 26 muestra los valores del factor de translocación de los metales en las tres especies vegetales, para mercurio (Hg^{+2}) las especies *Gynerium sagittatum* y *Heliconia psittacorum* tienden a translocar el metal desde sus órganos subterráneos a sus estructuras aéreas (tallo y hojas) cuando la concentración de este metal aumenta, este comportamiento se ve potencializado en *Gynerium sagittatum*.

El cromo total (Cr total), en *Colocasia esculenta* presenta un mayor factor de translocación cuando la concentración del cromo total aumenta, caso contrario ocurre en las otras dos especies *Gynerium sagittatum* y *Heliconia psittacorum*.

Como el cadmio (Cd^{+2}) solo se encontró en las partes subterráneas de *Colocasia esculenta* y *Heliconia psittacorum*, y en *Gynerium sagittatum* en todos sus órganos, solo en esta especie hubo translocación del metal más proporción para la concentración 1 de metales pesados, menor cantidad de cadmio.

Para el plomo (Pb^{+2}) las especies *Heliconia psittacorum* y *Gynerium sagittatum* transfiere el plomo en mayor proporción cuando su concentración es baja, caso contrario ocurre en *Colocasia esculenta* donde trasfiere más metal a sus partes aéreas cuando la concentración de plomo es alta.

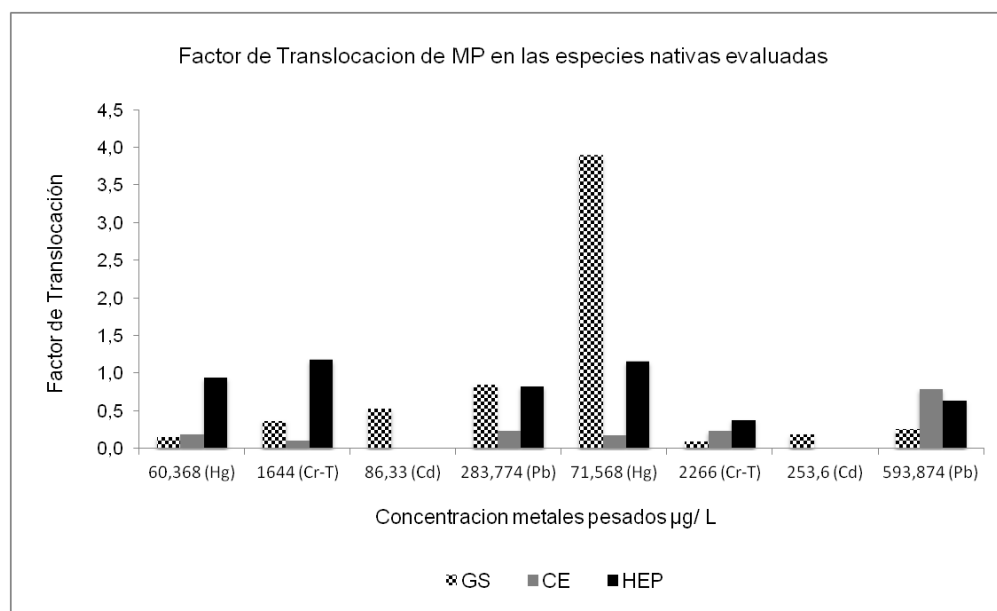


Figura 26. Factor de translocación de metales pesados en las tres especies vegetales. GS: *Gynerium sagittatum*, CE: *Colocasia esculenta* y HEP: *Heliconia psittacorum*.

Los metales pesados también pueden ser transportados a las partes superiores de la planta, en donde se concentra y se almacena. Como se observa en el caso específico de *Gynerium sagittatum* para el Hg (mercurio) ya que se encontró mayor concentración de este metal en las partes aéreas puede suceder por la acción de las catalasas presentes en las plantas, en donde se oxida el Hg a una forma menos reactiva para favorecer su acumulación (Ortega *et al.*, 2011). Pero en general las plantas prefirieron acumular el metal que translocarlo como se puede ver en la figura 32.

La figura 27 se observan los valores del factor de bioacumulación de los metales en las tres especies vegetales, para mercurio (Hg^{+2}) las tres especies tienden a bioacumular el metal en mayor proporción cuando la concentración de este metal aumenta, este comportamiento se ve claramente en *Gynerium sagittatum* y *Colocasia esculenta*.

El cromo total (Cr total), en *Colocasia esculenta* se bioacumula mas cuando la concentración del cromo total es menor, pero en *Gynerium sagittatum* aumenta la bioacumulación cuando la concentración del cromo total es mayor, y para *Heliconia psittacorum* la bioacumulación del metal es muy similar en las dos concentraciones.

El cadmio (Cd^{+2}) se tiende a bioacumular de manera similar en las dos concentraciones pero en *Gynerium sagittatum* en mayor proporción que en las otras dos especies, *Colocasia esculenta* y *Heliconia psittacorum*.

Para el plomo (Pb^{+2}) las especies *Heliconia psittacorum*, *Gynerium sagittatum* y *Colocasia esculenta* bioacumula el plomo en mayor proporción cuando su concentración es baja. *Colocasia esculenta* y *Gynerium sagittatum* bioacumulan el plomo en mayor proporción que en *Heliconia psittacorum*.

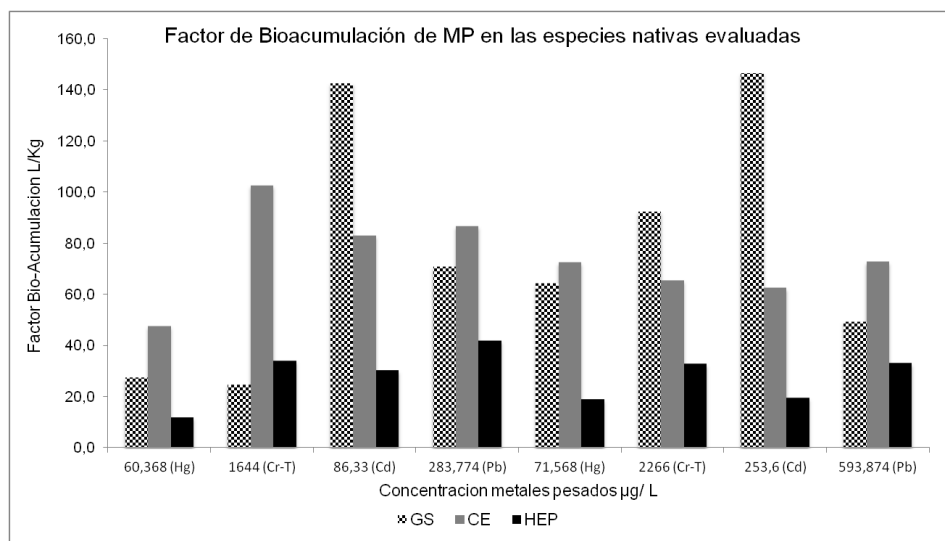


Figura 27. Factor de Bioacumulación de metales pesados en las tres especies vegetales. GS: *Gynerium sagittatum*, CE: *Colocasia esculenta* y HEP: *Heliconia psittacorum*.

En este estudio, algunas especies mostraron una menor capacidad de bioacumulación de uno o más metales de los cuatro que se estudiaron (Cd, Pb, Cr y Hg), lo que sugiere que esta planta adopta mecanismos de exclusión predominantemente del metal como una estrategia de tolerancia de toxicidad en lugar de mecanismos de bioacumulación que se basan en fuertes concentraciones de elementos en tejidos de la planta, lo que implica que para ese metal tiene una capacidad moderada estos resultados fueron similares a los encontrados por Bonanno (2011) donde la especie *Arundo donax* presento menor capacidad de bioacumulación al aluminio (Al). Además como lo sugiere Borin & Salvato, (2012) se debe hacer una correcta elección de las especies de los humedales ya que aunque en las tres especies de este estudio y las especies usadas en el trabajo de Borin & Salvato, (2012) con

las especies *Carex elata*, *Juncus effusus*, *Phalaris arundinacea*, *Phragmites australis*, y *Typha latifolia*, todas las especies crecieron regularmente la acumulación y translocación en las plantas dependen de la especie.

La toxicidad de los metales pesados (HM) es una de las tensiones abióticas principales que conducen a efectos peligrosos en las plantas. Una consecuencia común de toxicidad es la acumulación excesiva de especies de oxígeno reactivas (ROS) y metilglioxal (MG), ambos pueden causar la peroxidación de los lípidos, la oxidación de la proteína, la inactivación de las enzimas, daño en el DNA y/o interactuar con otros componentes vitales de las células vegetales. Las plantas superiores han desarrollado un sofisticado sistema de defensa antioxidante y un sistema de glyoxalase para secuestrar ROS y MG. Además, el MP que entran en la célula puede ser secuestrado por los aminoácidos, ácidos orgánicos, glutatión (GSH), o por unión específica de ligandos-metal. Estudios recientes de plantas a niveles moleculares han demostrado que el GSH y el metabolismo de las enzimas, en particular la glutatión S-transferasa, la glutatión peroxidasa, además de la desintoxicación, la formación de complejos, quelación y compartimentación de los MP en las vacuolas. Ayudan a la planta para sobrevivir a la carga de metales pesados, figura 28, (Hossain *et al* 2012). Lo que al parecer sucedió con las tres especies vegetales ya que ninguna planta murió, incluso *C. esculenta* y *H. psittacorum* creció más que la C1 (Concentración 1 de metales pesados), concentración 2 de metales pesados, y con tasa de crecimiento similares a las observadas en el tratamiento que no presentaba metales pesados (control).

Las plantas sufren daños por el exceso de metales pesados en el suelo o en el agua, lo cual afecta el desarrollo normal de las plantas. No obstante, las especies vegetales que son endémicas de suelos metalíferos son tolerantes a la toxicidad por metales pesados. Estas utilizan la estrategia de absorber gran cantidad de metales pesados y lo transfieren y acumulan en las partes aéreas, por lo que se denominan plantas hiperacumuladoras, (Cartaya *et al*, 2009 citado por Aulestia 2012).

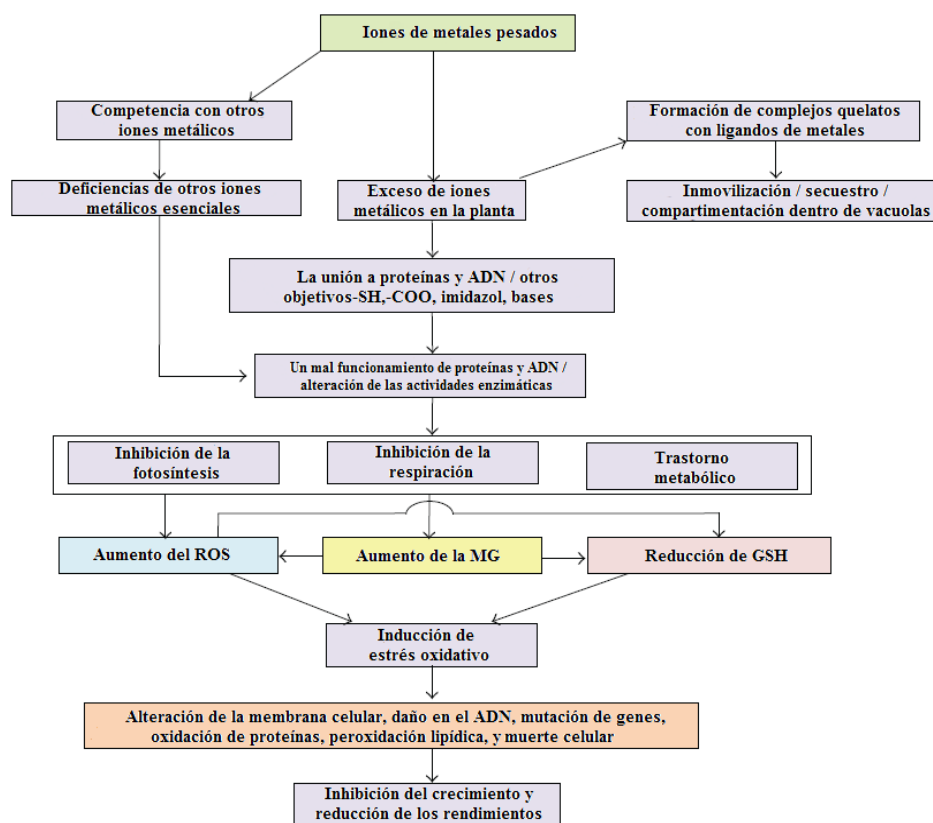


Figura 28. Posibles mecanismos bioquímicos y moleculares de los metales pesados mediados por la inducción de ROS y el daño al desarrollo de las plantas superiores. Acumulación excesiva de especies de oxígeno reactivas (ROS), metilglioxal (MG) y retención de los aminoácidos, ácidos orgánicos, glutatión (GHS). Modificado de Hossain *et al* 2012.

Las plantas hiperacumuladoras y especies de plantas tolerantes a los metales pesados (MP) brindan importantes inicios sobre la respuesta de las especies vegetales al estrés producido por los MP. Recientemente, se encontraron unos pocos genes responsables de la tolerancia adquirida. La expresión ectópica de estos genes relacionados con GSH y sus enzimas del metabolismo de las especies vegetales han mostrado resultados alentadores. (Hossain *et al* 2012). Además esta tolerancia y/o resistencia al estrés metálico puede estar asociado con uno o más mecanismos, tales como: (i) la excreción de compuestos quelantes que reducir la disponibilidad del metal en el suelo o el agua, (ii) la exclusión del metal a través de la absorción selectiva de elementos, (iii) la retención del metal en las raíces, impidiendo su

translocación a la parte aérea, (iv) la quelación o el secuestro de metales pesados por ligandos, compartimentalización, biotransformación y los mecanismos de reparación celular, (v) el desarrollo de enzimas tolerantes al metal, (vi) el aumento de la producción de compuestos intracelulares relacionadas con el metal, (vii) la inmovilización del metal en la pared celular, (viii) homeostáticos mecanismos celulares para regular la concentración de iones metálicos dentro de la célula, (ix) la inducción de proteínas de choque térmico; (x) la liberación de fenoles a partir de las raíces; (xi) el aumento de la tolerancia a la deficiencia de minerales o la disminución de los requerimientos nutricionales; (xii) el aumento en la absorción de macronutrientes ciertos y (xiii) el desarrollo de la capacidad de absorber y utilizar para minerales en la presencia de metales pesados (Shukla et al. 2011). La capacidad de las plantas para acumular y tolerar los MP seguirá proporcionando una gran cantidad de información.

9. CONCLUSIONES

- No se encontraron diferencias significativas de los datos obtenidos para las variables de crecimiento en *Gynerium sagittatum*, lo que sugiere que las plantas de esta especie no se vieron afectadas por el tipo de tratamiento.
- Para *Heliconia psittacorum* se encontraron diferencias estadísticas solo en el crecimiento de la longitud total, por lo cual el crecimiento de esta especie aumenta gradualmente a medida que la concentración de metales pesados es mayor.
- El crecimiento en *Heliconia psittacorum* no se afectó negativamente por la carga de metales pesados, al contrario en la concentración alta de metales se obtuvo mayor crecimiento.
- En la especie *Colocasia esculenta* (Oreja de burro) se presentan diferencias en el crecimiento de la longitud total, entre el tratamiento 1 y el control, donde la menor tasa de crecimiento se presentó a bajas concentraciones de metales pesados, y su crecimiento fue mayor para condiciones normales de la planta y concentraciones altas de metales.

- Los metales pesados tendieron a bio-acumularse en los tejidos vegetales principalmente en la raíz.
- De acuerdo a los resultados obtenidos sobre las respuestas de crecimiento frente a los tratamientos de lixiviados, las tres especies vegetales muestran la capacidad para ser usadas en la fitorremediación, especialmente *Colocasia esculenta* que acumuló altas concentraciones de los metales en sus tejidos fundamentalmente en la raíz y su crecimiento fue mayor para las plantas expuestas a la concentración 2 de metales pesados.

10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios a escala mayor (piloto) y ampliar el tiempo de experimentación sometiendo las plantas por mayor tiempo con el lixiviado.
- Estudiar los mecanismos de acumulación que les permite a las plantas tolerar, bioacumular y translocar las altas concentraciones de los metales pesados. Para comprender los mecanismos fundamentales que intervienen en las plantas hiperacumuladoras. Permitiendo desarrollar plantas idóneas para la fitorremediación de suelos y agua contaminadas con materiales contaminantes.

LITERATURA CITADA

AULESTIA, K. L. 2012. Respuesta fisiológica de tres especies vegetales nativas sometidas a tratamiento con lixiviado de relleno sanitario. Tesis de pregrado. Cali- Colombia. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias Naturales y exactas. 69pp.

BARCELÓ, J., & POSCHENRIEDER, C. 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. Contributions to Science 2 (3): 333-344.

BARRERA, J., SUAREZ, D., & MELGAREJO, L. M. 2010. Análisis de crecimiento en plantas. Cap. 2, págs. 25-37, en: MELGAREJO, L. M. ROMERO, M., & HERNANDEZ, S. (eds.). Experimentos en Fisiología Vegetal. Primera edición. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología.

BIO-SYSTEMS INTERNATIONAL. Humedales. Disponible en:
<http://www.biosystems.com.uy/img/humedales-esquema.jpg> (Consulta: 25 febrero 2011).

BONANNO, G. 2012. *Arundo donax* as a potential biomonitor of trace element contamination in water and sediment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80: 1-8,
 doi:10.1016/j.ecoenv.2012.02.005

BORIN, M., & SALVATO, M. 2012. Effects of five macrophytes on nitrogen remediation and mass balance in wetland mesocosms. *Ecological Engineering*, 46:34– 42.

BUGASEO SA ESP., 2009. Informe del sistema de tratamiento de lixiviado-Relleno sanitario de Presidente, Buga, Valle del Cauca, Colombia.

CARDWELL, A.J., HAWKER, D.W., & GREENWAY, M. 2002. Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia. *Chemosphere* 48, 653–663.

CARTAYA, O., PENICHE, C., & REYNALDO, I. 2009. Polimeros Naturales Recolectores de Iones Metalicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Volumen 10 (1)81-94.

CHENG, X., LIANG, M., CHEN, W. & LIU, X. 2009. Growth and contaminant removal effect of several plants in constructed wetlands', *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(3), 325-335.

CLARKE, E., & BALDWIN, A.H., 2002. Responses of wetlands plants to ammonia and water level. *Ecological Engineering*, 18(2002), 257-264.

CONTRERAS, A., & SUÁREZ, J. 2006. Tratamiento Biológico de Lixiviados de Rellenos Sanitarios. *Revista Respuestas*. Universidad María de Paula Santander. Año 11(1). 24pp.

DIMITRIOU, I., & ARONSSON, P. 2005. Sauces para energía y fitorremediación en Suecia. *Unasylva* 221(56): 47-50.

ECOQUIMICAS., (2011). Reporte de resultados del estudio de caracterización del lixiviado del relleno sanitario de Presidente, San Pedro, Valle del Cauca, Colombia.

FUENTES, R. 2011. Evaluación de *Canna sp.* Y *Heliconia sp.* Para el tratamiento de aguas servidas mediante un humedal artificial a escala piloto. Propuesta de trabajo de grado, magister en ciencias biológicas. Universidad Simón Bolívar, Decanato de estudios de Postgrado, Coordinación de Biología. 30 pp.

GARDEA, J., GÓMEZ, E., PERALTA, J., TIEMANN, K., PARSONS, J., TROIANI, H., & YACAMAN, M. 2004. Fitorremediación de metales pesados y formación de nanopartículas usando plantas de alfalfa. *Ciencia en la frontera: Revista de ciencia y tecnología de la UACJ*. 3: 49-53.

HOSSAIN, M. A., PIYATIDA, P., DA SILVA, J. A. T., & FUJITA, M. 2012. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. Hindawi Publishing Corporation, *Journal of Botany*, 37 pp.

KAUSAR, S. MAHMOOD, Q., RAJA, I. A., KHAN, A., SULTAN, S., GILANI, M. A., & SHUJAAT, S. 2012. Potential of *Arundo donax* to treat chromium contamination. *Ecological Engineering* 42:256– 259.

KEARNEY, M. A., & ZHU, W. 2012. Growth of three wetland plant species under single and multi-pollutant wastewater conditions. *Ecological Engineering* 47:214– 220.

LA AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES (ATSDR). 2008. Resúmenes de Salud Pública-cadmio. Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs5.html. (Consulta: 25 febrero 2011).

LA AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES (ATSDR). 2008. Resúmenes de Salud Pública-plomo. Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs13.html. (Consulta: 25 febrero 2011).

LA AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES (ATSDR). 2008. Resúmenes de Salud Pública-mercurio. Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs46.html. (Consulta: 25 febrero 2011).

LAI, W., ZHANG, Y., & CHEN, Z. 2012. Radial oxygen loss, photosynthesis, and nutrient removal of 35 wetland plants. *Ecological Engineering* 39:24– 30.

LÓPEZ, S., GALLEGOS, M., PÉREZ, L., & GUTIRREZ, M. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 21 (2): 91-100.

MADERA, C. A. 2011. Formulario propuesta proyecto cowetla.

MANTILLA, Y. & RIVAS, M. 1997. Efecto de diferentes aguas residuales sobre el crecimiento de la *Leucaena leucocephala*, *Revista de agronomía*. 43(3), 222-226.

MARA, D.D. 2003. Domestic wastewater treatment in developing countries. *Eartchscan*, UK, 293p.

MORALES, C. 2007. Estudio para la remoción de metales pesados en los lixiviados de relleno sanitario, Especialización en ingeniería ambiental con énfasis en ingeniería sanitaria, Universidad Nacional de Colombia, Manizales-Colombia.

MORENO Q, C., P., 2009. Factibilidad de la biodegradacion anaerobia de lixiviados en combinacion con agua residual doméstica. Trabajo de grado BSc, Universidad del Valle, Cali, Colombia

NAVARRO, J., AGUILAR, I., & LÓPEZ, J. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*. 16 (2): 10-25.

NIVALA, J., HOOS, M., CROSS, C., WALLACE, S., & PARKIN, G. 2007. Treatment of landfill leachate using an aerated, horizontal subsurface-flow constructed wetlands. *Scie of tot envi*, 380: 19-27.

ORTEGA, R. E., BELTRAN, J. D. & MARRUGO, J. L. 2011. Acumulación de mercurio (Hg) por caña flecha (*Gynerium sagittatum*) (Aubl) Beauv. in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1): 33-41.

PEÑA, E. J., PALACIOS, M. L. & OSPINA, N. A. 2005. Algas como indicadoras de contaminación. Colección Ciencia Naturales y Exactas. Universidad del Valle. 164 pp.

PEÑA VARON, M. R., 2002. Advance in primary treatment of domestic wastewater in tropical countries: Development of the high rate anaerobic pond, PhD thesis, University of Leeds, Leeds, UK.

PEÑA VARON, M.R., 2003. High rate anaerobic pond concept for domestic wastewater treatment: Results from pilot scale experience. Seminario internacional métodos naturales para el tratamiento de aguas residuales, Cartagena, Colombia.

PERÉZ, J. & GARCÍA, E. 2004. Análisis de crecimiento, área foliar específica y concentración en hojas de pasto mulato, *Revista Tec pecu Mexicana*, 42(3), 447-458.

PÉREZ, M., & ROJAS, J. 2009. Proyecto Cali visión 2036. Eje temático desarrollo territorial y medio ambiente. “Problemas ambientales en el municipio de Santiago de Cali”. Segunda versión. Instituto de Prospectiva: Innovación y gestión de conocimiento. Universidad del Valle. 55 p.

PILON-SMITS, E. 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:15-39.

PROCURADURÍA GENERAL DE LA NACIÓN. PROCURADURÍA DELEGADA PARA ASUNTOS AMBIENTALES Y AGRARIOS. 2004. Informe de seguimiento gestión de residuos sólidos en Colombia. Santafé de Bogota, D.C.

- ROONGTANAKIAT, N. 2009. Vetiver Phytoremediation for Heavy Metal Decontamination. Pacific Rim Vetiver Network: Technical Bulletin 2009 (1): 1-20.
- SAAD, I., CASTILLO, J., & REBOLLEDO, D. 2009. Fitorremediación: estudio de inteligencia tecnológica competitiva. Sinnco. 1-15.
- SHUKLA, O. P., JUWARKAR, S. A., SINGH, S. K., KHAN, S., & RAI, U.N. 2011. Growth responses and metal accumulation capabilities of woody plants during the phytoremediation of tannery sludge. *Waste Management* 31:115–123.
- SINGH, S., & SINHA, S. 2004. Scanning electron microscopic studies and growth response of the plants of *Helianthus annuus* L. grown on tannery sludge amended soil. *Environment International* 30:389–395.
- SKINNER K., WRIGHT, N., & PORTER, E., 2007. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. *Environmental Pollution*, 145: 234-237.
- TORRES, S., & VÁZQUEZ, R. 2010. Estudio de la potencialidad de especies vegetales nativas tropicales en la fitorremediación de lixiviados de rellenos sanitarios, con énfasis en metales pesados. Tesis de pregrado. Cali- Colombia. Universidad del Valle. Facultad de Ingeniería. 89 p.
- VYMAZAL, J. 2009. The use of constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. *Ecological Engineering* 35:1-17.
- VYMAZAL, J. 2011. Constructed wetlands for wastewater treatment: five decades of experience. *Environ. Sci. Technol.* 45: 61–69.
- ZWITERING, M. & ROMBOUTS, M. 1990. Modeling of bacterial growth curve. *Applied and environmental Microbiology* 56(6), 1875-1881.

ANEXOS

1. CÓDIGO PARA LA ALEATORIZACIÓN DE LAS PLANTAS “CUALES PLANTAS SE ASIGNAN A CADA REACTOR?”

```
Heliconia
k= 30 #disponibilidad
r=6   #reactores
n=3   #plantas por reactor
x<-1:k #vector de disponibilidad
plantas<-matrix(sample(x,n*r,replace=F),r,n,byrow=T)
rownames(plantas)<- c("Reactor c1r1", "Reactor c1r2", "Reactor c2r1", "Reactor c2r2", "Reactor cr1",
"Reactor cr2" )
```

2. CÓDIGO PARA LA ALEATORIZACIÓN DE LOS REACTORES “QUE TIPO DE PLANTA SE ASIGNA A CADA REACTOR?”

Para generar la aleatorización se empleo códigos en el programa R. Estos fueron:

#asignación aleatoria plantas – reactores bajo carga contaminante, se repite para cada réplica y para cada factor.

```
especies<-c("Heliconia", "Oreja de Burro", "Caña Brava", "Control")
orden<-sample(especies, 3, replace=F)
names(orden)<-c("Reactor 1", "Reactor 2", "Reactor 3", "Reactor 4")
orden
```

#asignacion aleatoria plantas – reactores bajo solución Hoagland-Controles.

```
especies<-c("Heliconia", "Oreja de Burro", "Caña Brava")
orden<-sample(especies, 3, replace=F)
names(orden)<-c("Reactor 1", "Reactor 2", "Reactor 3")
orden
```

3. CÓDIGOS PARA USO DE SOFTWARE R VERSIÓN 2010 PARA GENERAR CORRELACIÓN DATOS HISTÓRICOS DE DQO Y DBO.

#Datos Históricos BUGA ASEO

```
DQO<-c(7946.6,4463.6,2106.34,600,22467.2,17165.6,1457.8,4490,4380.4,5402,11091,4718.09,6315.9,6092.16,2376.86)
```

```
DBO<-c(6628.5,1540,1000,195.96,7694.8,7744.4,555.3,1266.7,1531.83,3005,3825,1708.1,2717.5,2733.3,1545)
```

#Datos Profe Madera UNIVALLE

```
DQO2<-c(5367,6141,6537,6811,6537,7228,6000,6218.04,6590.05,8769.02)
```

#Estableciendo la relación DQO vs DBO

```
modelo<-lm(DBO~DQO)
```

```

x=quantile(DQO2,0.5)
y=modelo$coefficients[1]+quantile(DQO2,0.5)*modelo$coefficients[2]
x1=quantile(DQO2,0.75)
y1=modelo$coefficients[1]+quantile(DQO2,0.75)*modelo$coefficients[2]
#Generando la figura
a<-matrix(c(1,1,1,2), 4, 1, byrow = TRUE)
layout(a)
#relacion historica (datos bugaseo)
plot(DQO, DBO, main="Relación Histórica DQO(mg/L) - DBO(mg/L)", xlab="DQO(mg/L)", ylab="DBO(mg/L)",
xlim=c(0,13000),ylim=c(0,8000))
abline(modelo, col="Red")
legend(8000,6000,legend = paste("DBO = ",round(modelo$coefficients[1],3),"
+",round(modelo$coefficients[2],3),"DQO"),cex=0.9)
segments(x,0,x,y, col = "Blue",lty=5)
segments(0,y,x,y, col = "Blue", lty=5)
segments(x1,0,x1,y1, col = "Green",lty=5)
segments(0,y1,x1,y1, col = "Green", lty=5)
#Comportamiento DQO mediciones recientes (UNIVALLE)Febrero 2010 - Abril 2011
boxplot(DQO2, ylim=c(0,13000), horizontal=T, main= "Comportamiento Actual DQO(mg/L)",xlab="DQO(mg/L)")
abline(v=c(x,x1), col =c("Blue","Green"),lty=5)

```

4. PROTOCOLOS PARA LA MEDICION DE METALES PESADOS EN AGUA Y PLANTAS.

Se tomaron muestras de 5 gr de los tejidos de las plantas sometidas al tratamiento (C1 y C2) fueron enviadas a los laboratorios de análisis industrial del Departamento de Química de Univalle para la determinación de Hg^{+2} y al laboratorio de análisis químico del instituto IHE de Holanda para la determinación de los otros metales (Pb^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+6}).

En el caso de las muestras para el IHE, previo al envío, estas fueron secadas en horno a 80°C por 24 horas en cajas de petri, posteriormente se realizó la molienda sobre el material seco en un triturador de muestras marca IKA a14 basic, con cuchillas A11-2.

A las muestras de las plantas secas y molidas se le realizó el siguiente procedimiento para la determinación de los metales pesados:

1. Se pesó como máximo 0,5 gramos de cada muestra en una balanza analítica.
2. La muestra se colocó en un tubo plástico y se le adicionó 10 ml de HNO_3 al 65%.

3. Las muestras se llevaron al microondas (CEM-Mars 5 X-press Duotemp, versión 194A07) por espacio de una hora, para hacer la digestión y extracción de los metales. Esta etapa constó de dos pasos a saber: a) Las muestras fueron calentadas desde la temperatura ambiental hasta 165°C proceso que duró 10 minutos, una vez alcanzada esta temperatura se mantuvo por espacio de 1 minuto.; b) Posteriormente la temperatura se elevó de 165 a 175 °C, proceso que duró 2 minutos y una vez se obtuvo esta temperatura se mantuvo por 5 minutos. Posteriormente se comienza el proceso de enfriamiento el cual tomó un tiempo de 30 minutos.

4. Las muestras digestadas se colocaron en balones aforados de 50 ml y llenados hasta el volumen con agua destilada.

5. Muestras de 5 ml de cada balón, fueron llevadas a otro balón de 50 ml y llenados con agua destilada hasta completar el volumen, teniendo una dilución de 1:10, las muestras se agitaron para obtener una buena mezcla.

6. Las muestras fueron vaciadas a recipientes plásticos de 75 ml.

7. Muestras de 10 ml fueron tomadas y llevadas al ICP-MS (Induced Coupled Plasma - Mass Spectrometer. Thermo scientific Type: X-serie 2), cuyo límite de detección es 1 ug L^{-1} para la determinación de Cr total, Cd^{+2} y Pb^{+2} .

Muestras de Agua.

Dado que se tenía diferencia en las concentraciones de los metales entre las muestras de afluente y efluentes, se procedió de la siguiente forma:

Afluente:

1. 5 ml de la muestra se llevó a un balón de 50 ml y se completó el volumen con agua destilada, agitando para lograr buena mezcla,
2. A la muestra diluida se le agrego 0,5 ml de HNO_3 al 65%, para un volumen total de 50,5 ml, se agito para alcanzar una mezcla buena,
3. Las muestras fueron llevadas a recipientes plásticos de 75 ml.
4. Muestras de 10 ml se tomaron y llevadas al ICP para la medición de Cr total, Cd^{+2} y Pb^{+2} .

Efluentes:

1. 0,25 ml de HNO_3 al 65%, se colocó en un balón de 50 ml y se completó el volumen con muestras de efluente. Se agitaron bien las muestras.
2. Las muestras fueron colocadas en recipientes plásticos de 75 ml.
3. Muestras de 10 ml fueron tomadas y llevadas al ICP para la medición de Cr total, Cd^{+2} y Pb^{+2} .

Para la medición de cromo hexavalente a las muestras de agua y tejidos de plantas, el procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Preparación de muestras patrón de Cr^{+6} y elaboración curva de calibración acorde con Kruis, (2010).
2. 10 a 25 ml de las muestras de agua (afluente y efluente) y de plantas preparadas acorde se explicó anteriormente se llevaron a un balón de 50 ml de volumen y se completó el volumen con agua destilada.
3. Se adicionó 2 gotas de H_3PO_4 .
4. Se agregó 1,0 ml de la solución de difenilcarbazida y se dejó en reposo por 10 minutos para el desarrollo de color.
5. 3 ml de la solución fueron llevadas a celdas de absorción y se le determinó la absorbancia en el espectrofotómetro (Perkin Elmer, LAMBDA 20) a una longitud de onda de 540 nm.

Mediciones de metales en grava.

210 gramos de grava fue tomado en cada uno de los reactores que operaron bajo las condiciones de tratamiento (C1 y C2). Las muestras fueron seleccionadas de los cilindros de malla instalados en cada reactor. Se pesó 70 gramos de grava del fondo, parte intermedia y superficial en una balanza analítica (Scout Ohaus SC 4010 con capacidad de 1000 gramos y un error de 0,1 gr), hasta completar la cantidad seleccionada.

En el caso del Cromo Hexavalente, se aplicó la técnica 3500 Cr-B Estándar Métodos (2005), para lo cual se tomó 25 g de grava en 100 ml de agua destilada y se realizó el siguiente procedimiento:

1. Adicionó Ácido Nítrico 1 N hasta obtener un pH 2,0 +/- 0,5 unidades
2. La muestra se agitó y dejó en contacto por 1 hora a temperatura ambiente

3. Posteriormente se tomó 50 ml de la muestra y se llevó a un balón de 100 ml, el cual se llenó con agua destilada hasta completar su capacidad.
 4. La muestra se filtró utilizando un filtro (S&S) de diámetro de poro 125 mm
 5. Se adicionó 2 ml solución de difenilcarbazida (desarrollo de color)
 6. Se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro (UV-1800 Shimadzu) a una longitud de onda de 540 nm.
5. Los datos para las variables de crecimiento tomados al inicio y al final se encuentran en la tabla 32 donde se observa el aumento en todas las variables tanto de longitud como de peso lo cual indica que las plantas aprovecharon los nutrientes del lixiviado y toleraron de manera satisfactoria las concentraciones de los cuatro metales pesados estudiados.

Tabla 32. Variables de crecimiento tomadas al inicio y al final del experimento.

	Especie	Planta	PESOS en gramos						LONGITUD en cm					
			Peso inicial	Peso final total	Peso final hoja	Peso final tallo	Peso final raíz	Peso final ramas	L. Tallo inicial	L. Tallo final	L. Raiz inicial	L. Raiz final	Longitud Total Inicial	Longitud Total Final
Línea 1	Caña Brava R1	P1	3,5	4,1	2,6	1,2	0,3		14	21	5,6	7	-	-
		P2	4	9,6	4,6	2,4	2,6		18	36	8	15,6	22,4	40,1
		P3	15	33,2	18,2	10,8	4,2		28	56	13	28,5	-	-
		Total Reactor	23	46,9	25,4	14,4	7,1							
	Oreja Burro R1	P1	11	12,4	1,6	1,4	1,8	7,6	2	2,5	10,5	16	38,1	40,9
		P2	13	119,6	14,6	3,8	10	91,2	2,3	2,5	4	17	-	-
		P3	16	20	3,2	1,8	1,2	13,8	1	2,3	3	7,5	-	-
		Total Reactor	40	152	19,4	7	13							
	Heliconia R1	P1	23	28,4	4	17,8	6,6		18	32,2	13	19,5	-	-
		P2	7	13,4	3	7,8	2,6		19,4	23	11,3	21	19,8 (hoja 1)	22,7 (hoja 6)
		P3	6	6,6	2,8	3,6	0,2		15	23,5	1	1,3	-	-
		Total Reactor	36	48,4	9,8	29,2	9,4							
	Oreja Burro R2	P1	11	21,6	2,2	1,2	0,8	17,4	2,5	3,2	4	7,5	-	-
		P2	11	19,8	1	0,8	1,4	16,6	1,2	1,5	5,6	11,5	-	-
		P3	16	26,4	3	1,2	1,6	20,6	1,3	1,6	6	16,5	44,2 (hoja 1)	47,9 (hoja 3)
		Total Reactor	38	67,8	6,2	3,2	3,8							
Caña Brava R2	P1	15	23,2	7,8	11	4,4		10	49	6,2	14,5	-	-	
	P2	13	18	6,2	3,8	8		31,3	39,3	8	10	32	38,9	
	P3	14	12,6	4,6	5,6	2,4		37	66	6	10	-	-	
	Total Reactor	42	53,8	18,6	20,4	14,8								

Linea 2	Heliconia R2	P1	4,5	5,2	0	2,4	2,8		13,2	16,4	2	5,2	-	-
		P2	9	9,8	1	3,8	5		15,6	20,2	11,5	13,1	-	-
		P3	10	26,6	4,6	11,6	10,4		20,5	25,2	6,3	8,5	21	23,1
		Total Reactor	23,5	41,6	5,6	17,8	18,2							
	Heliconia Control	P1	13	46,6	9,2	23,2	14,2		28,6	33,1	5,7	14,2	-	-
		P2	8	14,6	3,4	7,6	3,6		22,1	24,6	3,3	11,3	-	-
		P3	10	16	2,8	7,6	5,6		18	21	5	9,6	18,4	20,4
		Total Reactor	31	77,2	15,4	38,4	23,4							
	Caña Brava Control	P1	39	68,8	29	32,4	7,4		15,7	29,5	4	4,5	-	-
		P2	17	25,6	14	9	2,6		12	27	3	3	-	-
		P3	42	78,2	29	36,8	12,4		13,2	35	1,8	4	13,9	33,8
		Total Reactor	98	172,6	72	78,2	22,4							
	Oreja Burro Control	P1	38	473,8	62	8,4	62,2	341,2	3,6	77,5	19	39	-	-
		P2	28	62,2	9	1,2	2,6	49,4	3	51	8	25	50,6 (hoja 3)	60,1 (hoja 6)
		P3	32	161,4	15,6	7	8,2	130,6	5	80	13	33,5	-	-
		Total Reactor	98	697,4	86,6	16,6	73							
	Oreja Burro R1	P1	10	16	1,6	5	1,2	8,2	4	6,7	10	12,3	-	-
		P2	18	36,6	4,6	2,4	2,4	27,2	2,5	4,8	5	12,5	42 (hoja 1)	45,8 (hoja 4)
		P3	10	28,8	1,8	1,8	1,8	23,4	2	2,3	13,5	20,1	-	-
		Total Reactor	38	81,4	8	9,2	5,4	58,8						
	Heliconia R1	P1	8	10	1,8	5,6	2,6		19,1	24	6	7	19,4	22,3
		P2	12	13,8	3	7,2	3,6		18	21	4	8,5	-	-
		P3	6	8,4	1	4,6	2,8		16,3	20,6	3,5	5,5	-	-
		Total Reactor	26	32,2	5,8	17,4	9							
	Caña Brava R1	P1	15	22,4	10,2	9,2	3		36	58,6	4,5	13,1	-	-
		P2	4	5	2,4	1,2	1,4		2	3	6,2	8	-	-
		P3	14	28,6	15,6	8,2	4,8		28	49,2	18	32,5	43,1	49,1
		Total Reactor	33	56	28,2	18,6	9,2							
	Oreja Burro R2	P1	8	8,7	0,6	3,4	0,9	3,8	2,3	3,5	2,5	3,5	-	-
		P2	19	25,4	3,2	2,6	1,2	18,4	1,2	2	7,5	14,5	31,8 (hoja 2)	53,7 (hoja 3)
		P3	10	12,6	1	1,6	0,6	9,4	3	3	8	11	-	-
		Total Reactor	37	46,7		7,6	2,7							
	Heliconia R2	P1	3,2	4,4	0	2,2	2,2		13,2	15,3	4	6,1	-	-
		P2	9,6	10,3	0,3	6,8	3,2		26,9	31	3,9	6,9	-	-
		P3	9	11,8	2,2	5,4	4,2		16	18,2	4,8	7,6	15,2	17,8
		Total Reactor	21,8	26,5	2,5	14,4	9,6							
	Caña Brava R2	P1	6	8,4	3	2,6	2,8		14	29	7	17	23,1	24,8
		P2	15	48,2	18,8	23,8	5,6		38,7	64,5	11	21,5	-	-
		P3	10	15	7,2	6	1,8		17,3	38,5	15,7	36	-	-
		Total Reactor	31	71,6	29	32,4	10,2							

Oreja Burro Control	P1	30	124,8	15,8	3,8	3,2	102	2	2,2	16	24,6	66,3 (hoja 3)	71,7 (hoja 4)
	P2	16	68,8	7,6	2,6	2,6	56	2	2,3	13	23,2	-	-
	P3	12	50,6	4,4	3,4	5,4	37,4	1,8	2,6	8	17,7	-	-
	Total Reactor	58	244,2	27,8	9,8	11,2							
Heliconia Control	P1	10	27	4	10,6	12,4		25	27,1	6	13,3	-	-
	P2	14	37,4	5	12,6	19,8		29,7	31,5	4,5	11,1	-	-
	P3	15	16,2	2,8	7,2	6,2		21,8	23,1	5,9	10,5	19,1 (hoja 1)	22,2 (hoja 3)
	Total Reactor	39	80,6	11,8	30,4	38,4							
Caña Brava Control	P1	5	5,6	3,2	1,4	1		10,5	27,2	6	24,3	11,3	27
	P2	14	69,4	26,4	28,2	14,8		20,8	51,4	7	25,4	-	-
	P3	10	45,4	15,2	26,6	3,6		24,3	49,2	6,5	32,1	-	-
	Total Reactor	29	120,4	44,8	56,2	19,4							

6. Registro fotográfico:

En la Tabla 33 se puede observar las diferentes etapas del proyecto desde la fase inicial donde se cultivaron las plantas el cual se denominó fase de aclimatación y seguido de la fase de arranque o la fase experimental donde se inició el tratamiento con lixiviado sintético de relleno sanitario y por último la finalización del experimento.

Tabla 33. Registro fotográfico de las diferentes fases del proyecto de investigación.

Fases del proyecto	Tratamiento
Inicio: Aclimatación 	

Arranque de
la fase
experimental



Línea 1 (concentración 1 de metales pesados
y 3 controles “recipientes verdes”)



Línea 2 (concentración 2 de metales pesados
y 3 controles “recipientes verdes”)

Finalización de
la fase
experimental



Línea 1 (concentración 1 de metales pesados
y 3 controles “recipientes verdes”)



Línea 2 (concentración 2 de metales pesados
y 3 controles “recipientes verdes”)