

Plantas acuáticas con potencial para fitoextracción de Cadmio en arrozales del Cantón Daule, provincia del Guayas, Ecuador

Aquatic plants with potential for phytoextraction of Cadmium in rice fields of Daule Parish, Province of Guayas, Ecuador

Beatriz Pernía^{1,*}, Mariuxi Mero², Jorge Muñoz³, Kenya Bravo³, Naskia Morán³, Josué Zambrano⁴, Xavier Cornejo⁵, Ámbar Benavides⁴ & Genoveva Torres²

¹ Docente de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo, Guayaquil, Ecuador

² Investigador del Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales (IIRN), Universidad de Guayaquil, Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo, Guayaquil, Ecuador

³ Egresado de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo, Guayaquil, Ecuador

⁴ Estudiante de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo, Guayaquil, Ecuador

⁵ Herbario GUAY, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo, Guayaquil, Ecuador

Recibido 19 de octubre 2016; recibido en forma revisada 7 de noviembre 2016, aceptado 14 de noviembre 2016
Disponible en línea 31 de diciembre 2016

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue hallar plantas fitoextractoras de Cd asociadas a las áreas de producción de arroz, con la finalidad de proponer una estrategia para la mitigación de la contaminación por este elemento. Se realizaron salidas de campo a la zona de estudio localizada en el Cantón Daule, en la provincia del Guayas, Ecuador. Se tomaron muestras de las siguientes especies asociadas a los cultivos, que habían previamente sido referenciadas como plantas hiperacumuladoras de Cd: *Azolla* sp., *Eichhornia crassipes* y *Limnocharis flava*. Las plantas se reprodujeron para realizar bioensayos de tolerancia y determinar su factor de bioconcentración (FBC). Para ello, las plantas en estudio se expusieron a 0, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/L Cd, durante 7 días. Las muestras se lavaron con agua destilada, se secaron en estufa, y se determinó la biomasa en peso seco en balanzas analíticas. La digestión de muestras se realizó con HNO₃ y H₂O₂, para la lectura de Cadmio se utilizó un Espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer AAnalyst 100). Las especies más tolerantes fueron *E. crassipes* y *L. flava*; *Azolla* sp. presentó inhibición de crecimiento. El índice de tolerancia de *Limnocharis* fue de 116,46 %, y de *Eichhornia* fue de 123,57%. El mayor FBC lo presentó *Azolla* (6136,13±25,28), seguido por *Eichhornia* (2656,74±1429,10) y finalmente por *Limnocharis* (1860±320). La mayor captación de Cd se observó en la biomasa de *Azolla* (6136±25,28 mg/Kg Cd), en raíces de *Eichhornia* (1482±368,41 mg/Kg Cd) y en raíces de *Limnocharis* (817,3±100,7 mg/kg Cd). En el tratamiento de 0.25 mg/L de Cd se encontraron los mayores porcentajes de remoción en las soluciones: 46,3% 100% y 30% para *Azolla*, *Eichhornia* y *Limnocharis*, respectivamente. Como una estrategia de mitigación, se propone el co-cultivo de las especies fitoextractoras aquí estudiadas para que compitan por el Cd con las plantas de *Oryza sativa*.

Palabras clave: *Azolla*, bioacumulación, cadmio, Ecuador, *Eichhornia crassipes*, fitoextractoras, *Limnocharis flava*, mitigación.

* Correspondencia del autor:
E-mail: beatrizpernia@gmail.com



Abstract

The aim of the present work was to find native plants associated to rice crops for Cd phytoextraction in order to elaborate a strategy for mitigation of contamination by Cd. Field trips were conducted in the study area, located in Daule parish, province of Guayas, western Ecuador. The following species associated to rice crops, those previously recorded in the literature as hyperaccumulators of Cd, were sampled: *Azolla* sp., *Eichhornia crassipes* and *Limnocharis flava*. Tolerance and the bioconcentration factor (BCFs) were tested on plants reproduced in lab. During seven days those were exposed at 0, 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/L Cd. Samples were rinsed with distilled water and oven-dried, the biomass was recorded dry on analytic weights. Samples were digested with HNO₃ and H₂O₂, Atomic Absorption Spectrophotometer (Perkin Elmer AAnalyst 100) was used for Cd reading. Species with high tolerance were *Eichhornia crassipes* and *Limnocharis flava*; meanwhile *Azolla* sp. displayed growth inhibition. Tolerance index for *Limnocharis* is of 116,46 %, and for *Eichhornia* is of 123,57%. Highest BCFs was recorded for *Azolla* (6136,13±25,28), followed by *Eichhornia* (2656,74±1429,10), and finally by *Limnocharis* (1860±320). Highest concentration of Cd was recorded on the biomass of *Azolla* (6136±25,28 mg/Kg Cd), roots of *Eichhornia* (1482±368,41 mg/Kg Cd), and roots of *Limnocharis* (817,3±100,7 mg/kg Cd). Highest percentages of retrieval on solutions of 46,3% 100% and 30% were found on a treatment of 0.25 mg/L of Cd for *Azolla*, *Eichhornia* and *Limnocharis*, respectively. A mixed culture of *Oryza sativa* jointly with the herein reported plant species for phytoextraction is recommended to compete with each other for Cd as an strategy for mitigation.

Key words: *Azolla*, bioacumulación, cadmio, Ecuador, *Eichhornia crassipes*, fitoextractoras, *Limnocharis flava*, mitigación.

Introducción

El Cd es uno de los metales pesados más tóxicos y móviles en los suelos agrícolas. Este es capaz de transferirse a las plantas y acumularse en las partes comestibles, generando reducción en la productividad de las cosechas y una variedad de efectos tóxicos agudos y crónicos en los seres humanos (Wan et al., 2016). Se ha asociado al Cd una serie de enfermedades tales como diabetes, osteoporosis, hipertensión, daño renal y cáncer (Clemens et al., 2013). En las plantas, altas concentraciones de Cd generan cambios a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico, tales como inhibición del crecimiento, déficit hídrico, inhibición de la fotosíntesis y la germinación, estrés oxidativo, entre otros efectos que traen como consecuencia pérdidas económicas en la agricultura y ponen en peligro la seguridad alimentaria (Pernía et al., 2008; Sharma & Archana, 2016).

En Ecuador existen evidencias de contaminación por Cd en suelos agrícolas. Félix et al. (1986) hallaron Cd en suelos de cultivos de café (0,020-0,303 mg/kg Cd), palma africana (0,02-0,68 mg/kg Cd), banano (0,09-0,38 mg/kg Cd) y plátano (0,06-0,096 mg/kg Cd). De igual forma, Mite et al. (2010) encontraron altos contenidos de Cd en suelos de cultivo de cacao en varias provincias de Ecuador: Esmeraldas (0,22-0,88 mg/kg Cd), Santo Domingo (0,33-0,53 mg/kg Cd), Los Ríos (0,17-0,66 mg/kg Cd), Manabí (0,46-2,37 mg/kg Cd) y en Guayas (0,25-1,65 mg/kg Cd). Además, Chávez et al. (2015) hallaron valores de 0,66-2,59 mg/kg Cd en suelos de cultivo de cacao en la Provincia del Guayas.

En cuanto a los cultivos de arroz, Pozo et al. (2011) reportaron 0,04-0,39 mg/kg Cd en suelos a orillas

del río Babahoyo. Finalmente, nuestro equipo de investigación analizó la concentración de Cd en suelos de cultivo de arroz en los cantones Daule y Nobol, registrando valores de 0,26-2,86 mg/kg Cd (Muñoz et al., 2016). Según el Texto Unificado de Legislación Secundaria y Medio Ambiente, en el Libro VI, Anexo 2, sobre los criterios de calidad del suelo en Ecuador, se indica como límite máximo permisible 0,5 mg/kg Cd; sin embargo, las normas internacionales son aún más estrictas en cuanto a los suelos agrícolas, sugiriendo como valor crítico 0,43 mg/kg de Cd (USEPA, 2002). Esto indica que varios suelos de uso agrícola superan los límites permisibles, por lo que se hipotetiza que las plantas de cultivo en Ecuador podrían estar acumulando Cd.

Según algunos autores, la contaminación por Cd en la provincia de Guayas es de origen geogénico y antropogénico, pero se ha reportado que en los suelos agrícolas los principales responsables son el uso de fertilizantes fosfatados y las aguas de riego proveniente de ríos contaminados (Pozo et al., 2011; Chávez et al., 2015). La provincia del Guayas contiene la mayor cantidad de hectáreas cultivadas con arroz en Ecuador; se estiman unas 87.888 ha, de las cuales 17.027 ha corresponden al cantón Daule (Aguilar et al., 2015). Este cantón posee una tierra privilegiada para la producción de arroz por las condiciones únicas de sus suelos, su ubicación a escasos metros del nivel del mar con una alta luminosidad solar y la provisión constante de agua (Prefectura del Guayas, 2016). Sin embargo, estos suelos son irrigados con agua del río Daule, el cual se encuentra contaminado con Cd a razón de 0,011±0,003 mg/L Cd (Ramírez et al., 2016).

Dentro de las plantas de cultivo, el arroz (*Oryza sativa* L.) es una de las especies con mayor capacidad de

acumular Cd y transferirlo a su parte comestible y consecuentemente a la cadena trófica, por lo que es urgente tomar medidas para mitigar este problema. En Daule se detectaron valores altos de Cd en raíces $0,50 \pm 0$ mg/kg, en hojas $0,44 \pm 0,08$ mg/kg y en granos $0,19 \pm 0,050$ mg/kg de arroz (Muñoz et al., 2016).

En los últimos años se han desarrollado estrategias como la reducción de la biodisponibilidad del metal en el suelo, adicionando compuestos como silicato de calcio, hierro y magnesio para que compitan con el Cd (Liu et al., 2013; Zhao y Saigusa, 2007). Otros autores sugieren el uso de tecnologías que presentan la desventaja de ser más costosas, implican largos periodos de tiempo, generan daño a la estructura del suelo o causan contaminación secundaria (Khan et al., 2000). Es por ello que la estrategia más segura y rentable es la fitorremediación, esta es una biotecnología efectiva, económica y ambientalmente aceptada donde se utilizan plantas para descontaminar agua y suelos (Castrillo et al., 2012; Sytar et al., 2016).

En este sentido, en otros países se han utilizado plantas hiperacumuladoras de Cd tales como *Thlaspi caerulescens* o *Brassica juncea* (ambas Brassicaceae) en intercultivo en modo de rotación de cultivos con plantas de arroz, como estrategia para disminuir los niveles de Cd de los suelos agrícolas (Keller y Hammer 2004; Wu et al., 2011). Sin embargo, para evitar la introducción de especies exóticas, el objetivo del presente trabajo fue hallar plantas nativas fitoextractoras de Cd asociadas a las áreas de producción de arroz en el cantón Daule, en la provincia del Guayas, en la costa de Ecuador, y proponer una estrategia para la mitigación de la contaminación, cuya finalidad es: i) Evitar la introducción de especies, ii) Determinar el potencial de acumulación de Cd de las especies nativas seleccionadas, y, 3) Remover el Cd del medio.

Materiales y métodos

Área de estudio

El presente trabajo se realizó en el cantón Daule, ubicado a 22 msnm, con una temperatura promedio de 24°C y una precipitación promedio anual de 1500 msnm (Prefectura del Guayas, 2016). Dentro de su red hidrográfica se encuentra el río Daule, el cual abastece de agua a la mayor parte de los cultivos. El área de estudio (Fig. 1) se localizó en 3 arroceras cercanas al río Daule, sus coordenadas geográficas se muestran en la Tabla 1.

Especies seleccionadas

Se realizó una inspección en el área de estudio y se seleccionaron las especies de plantas descritas en la literatura como hiperacumuladoras de Cd (Fig. 2), éstas son: *Azolla* sp., *Eichhornia crassipes* y *Limnocharis flava*. Las plantas fueron colectadas en bolsas plásticas estériles y transportadas hasta el Instituto de Investigaciones y Recursos Naturales de la Universidad de Guayaquil (IIRN), donde se lavaron con agua corriente para eliminar epífitos, larvas y fueron

reproducidas para los bioensayos. A continuación se describen las características de las especies seleccionadas:

Azolla Lam., es un diminuto helecho acuático de la familia Salviniaceae. Este posee una alta velocidad de crecimiento, crece en simbiosis con la cianobacteria *Anabaena azollae* Strasb., la cual le permite fijar grandes cantidades de nitrógeno ambiental. Numerosos autores han descrito este helecho como acumulador de metales pesados (El-all et al., 2011; Tan et al., 2011; Sela et al., 1988; Pandey, 2012).

Eichhornia crassipes (Mart.) Solms, es una planta acuática flotante perteneciente a la familia Pontederiaceae, comúnmente es conocida como Jacinto de agua. Esta posee un rápido crecimiento, una gran capacidad de reproducción y es originaria de Brazil (Patel, 2012). Ha sido introducida como una planta ornamental en algunos países tropicales y debido a su rápido crecimiento y adaptabilidad se ha convertido en una especie invasora (Patel, 2012). Por su capacidad de acumular metales pesados, especialmente Cd, en la actualidad se la está utilizando en el tratamiento de aguas servidas (Agunbiade et al., 2009; Carrión et al., 2012; Mahamadi, 2012; Zhang et al., 2015).

Limnocharis flava (L.) Buchenau, es una maleza acuática enraizada perteneciente a la familia Alismataceae. Habita en pantanos poco profundos, acequias, piscinas y campos de arroz anegado, se reproduce en aguas estancadas (Abhilash et al., 2008). Recientemente ha sido descrita como una especie hiperacumuladora de Cd (Anninget al., 2013; Rachmadiarti et al., 2012; Abhilash et al., 2009).

Cultivo de las plantas

Las plantas de *Eichhornia crassipes* se reprodujeron en piscinas ubicadas en el Laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil. *Azolla* sp. se reprodujo en envases de plástico de 30 cm diámetro y 2 L de solución nutritiva, para la cual se utilizó el fertilizante Multiflor® según las indicaciones del fabricante. *Limnocharis flava* se cultivó a partir de semillas colectadas de individuos que se encontraban creciendo junto a las plantas de arroz en el cantón Daule. Las semillas fueron transferidas a envases de plástico que contenían suelo del humedal y una capa de 10 cm de solución nutritiva. Las semillas germinaron a los 15 días y se dejaron crecer por 3 meses.

Tabla 1. Coordenadas geográficas del área de estudio.

Cantón	Muestra	UTM	
		X	Y
Daule	D1	610860	9793821
Daule	D2	609384	9796267
Daule	D3	608122	9799508
Daule	D4	624237	9782381
Daule	D5	621097	9783651
Daule	D6	616878	9781867

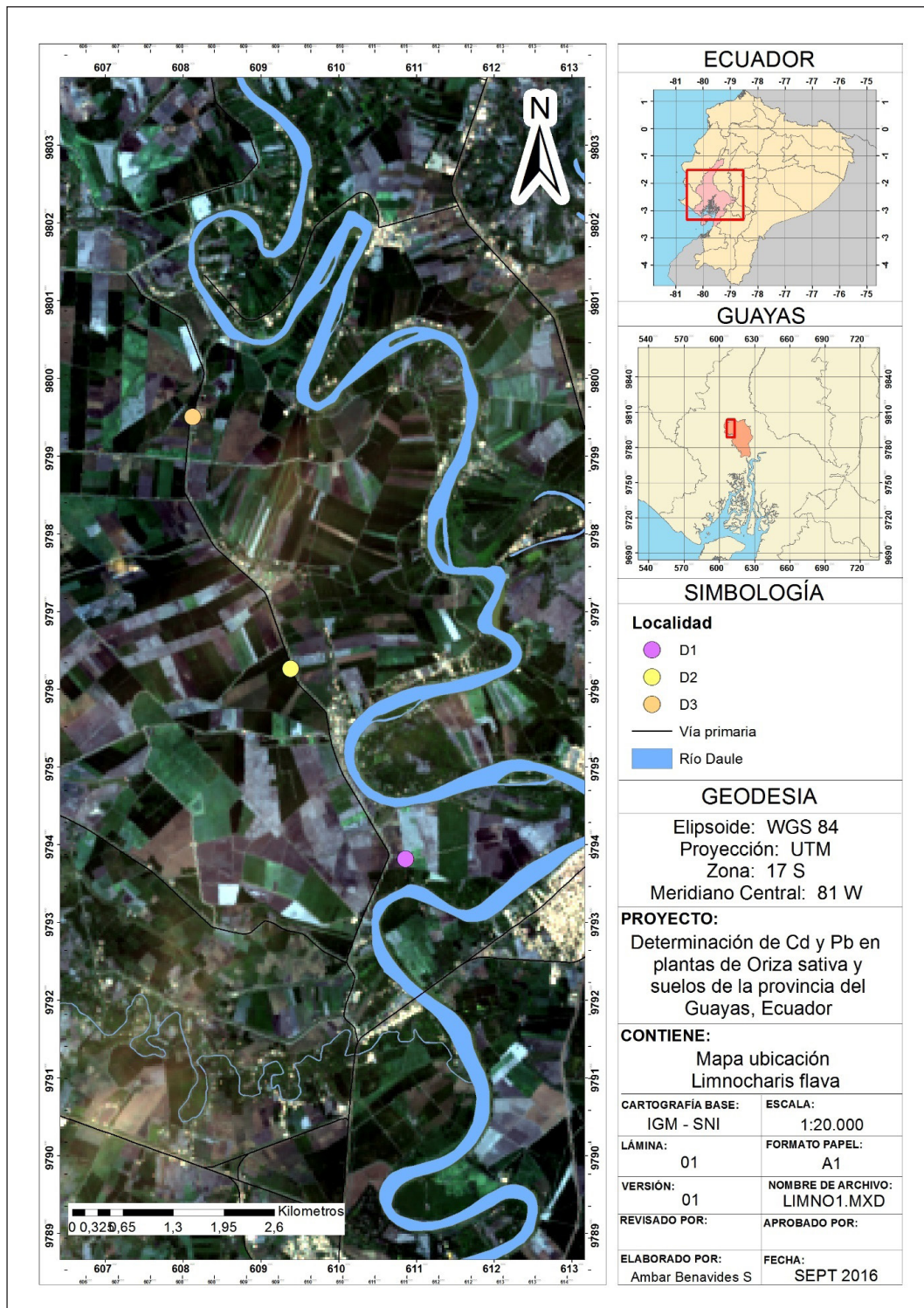


Figura 1. Mapa del área de estudio.

Las plantas se cultivaron a la sombra a temperatura ambiente de 24°-33°C, un fotoperiodo de 12h y radiación promedio de 4574,99 Wh-m²/10.

Bioensayos

Plantas de la misma edad y tamaño fueron aclimatadas en solución nutritiva por 15 días previo al experimento en envases de plástico de 15 cm de diámetro y capacidad de 2 L, a los cuales se les añadió solución nutritiva ajustada a un pH de 5,5 (pH promedio del suelo de las arroceras) utilizando HCl (1N). Posteriormente, en el caso de *L. flava* se les colocó una tapa de espumafón y en el centro de la tapa se abrió un agujero para insertar las plantas (Fig. 2). Una vez aclimatadas fueron expuestas por 7 días a una solución nutritiva (pH 5,5) con distintas soluciones de CdCl₂: 0 (grupo control), 0,25, 0,50, 1 y 2 mg/L CdCl₂. Como control abiótico se colocó otra unidad experimental con 2 mg/L CdCl₂ sin plantas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Después de los 7 días de exposición al Cd las plantas fueron lavadas con agua destilada para retirar los excesos de Cd y se dividieron en raíces, tallos y hojas. Se pesaron en una balanza analítica Sartorius modelo BL210S y se llevaron a peso seco constante a 70°C durante 3 días en una estufa Metler. Se determinó el peso fresco y la biomasa por órganos, así como la tolerancia al Cd. Para determinar la tolerancia al Cd en las plantas se comparó el peso seco de la raíz y del vástago entre plantas tratadas y no tratadas, utilizando la siguiente fórmula: Índice de tolerancia (%) = crecimiento en la solución + metal x 100/ Crecimiento en la solución-metal (Wilkins, 1978).

Procesamiento

La solución de cada uno de los tratamientos fue acidificada con 1% HNO₃ y filtrada con papel Whatman N°40. Las plantas una vez secadas fueron trituradas y se pesaron en una balanza analítica Sartorius modelo BL210S, fueron digeridas en ácido nítrico y peróxido de hidrógeno para luego ser calentadas a 70°C en una plancha de calentamiento (PMC), según la metodología de Thayaparan et al. (2013).

A continuación, las muestras procesadas fueron filtradas con papel Whatman N°40 para consiguientemente enrasarlas a 50 ml con agua bidestilada en matraces. Las muestras de soluciones y plantas digeridas fueron analizadas en un Espectrofotómetro de absorción atómica de llama Perkin Elmer modelo AAnalyst100, usando la metodología interna del laboratorio del IIRN basada en la metodología descrita en Standard Methods (2005). Para generar las curvas de calibración se utilizaron estándares comerciales de Cd (AccuStandar). Las muestras se leyeron a 228,8 nm para el Cd, con un límite de detección de 0,002 mg/kg. Todas las mediciones se realizaron por triplicado (n=3).

Factor de Bioconcentración

La capacidad de acumular metales pesados se determinó utilizando el Factor de Bioconcentración

(FBC). Este es la relación entre el Cd acumulado en la planta y el Cd presente en el medio (Brooks, 1998), y se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$FBC = \frac{\text{Concentración de Cd en la planta}}{\text{Concentración de Cd en el sustrato}}$$

Factor de Transferencia

El factor de Transferencia (FT) expresa la capacidad de transferir el metal pesado de las raíces al vástago (Brooks, 1998). Se determina con la siguiente fórmula:

$$FT = \frac{\text{Concentración de Cd en el vástago}}{\text{Concentración de Cd en la raíz}}$$

Análisis estadísticos

Los resultados se muestran como medias ± desviaciones estándar (n=3). Las gráficas se realizaron utilizando el programa OriginPro8. Se determinó la normalidad de los datos mediante una prueba de Anderson-Darling y la igualdad de varianzas por un test de Levene. Para comparar las medias de las biomásas, concentraciones de Cd, y factores de bioconcentración se empleó una ANOVA de una vía, tomando p<0.05 como valor significativo y un test a posteriori de Tukey. En los casos donde no hubo normalidad se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para determinar la posible correlación entre el Factor de Bioconcentración (FBC) y las diferentes concentraciones de Cd se utilizó Regresión lineal y Correlación de Pearson y finalmente se empleó estadística multivariada para analizar la correlación entre todas las variables mediante un Dendrograma. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa MINITAB versión 17.0.

Resultados

Las siguientes especies previamente referenciadas como plantas hiperacumuladoras de Cd han sido registradas asociadas a los cultivos en el cantón Daule en la provincia del Guayas, Ecuador (Fig. 1): *Azolla* sp., *Eichhornia crassipes* (en albarradas cercanas a los cultivos) y *Limncharis flava* (junto a los cultivos).

Efectos del Cd sobre la biomasa y el índice de tolerancia de las plantas

En *Azolla* sp. (Fig. 3) se observó una reducción en el crecimiento estadísticamente significativa desde los 0,25 mg/L (F= 13,80; p=0,000). El control presentó una biomasa de 0,395± 0,068 g y en el tratamiento con 0,25 mg/L CdCl₂ la biomasa se redujo a 0,064±0,001 g, lo que representa un 83,8%. En el tratamiento de 0,5 mg/L CdCl₂ la reducción fue de 57,3% y de 80,7% a 2 mg/L CdCl₂; sin embargo, las diferencias entre los tratamientos con Cd no fueron significativas (p>0,05). Esta reducción en la biomasa de *Azolla* indica toxicidad por parte del Cd para esta especie. También se observó una pigmentación púrpura en las hojas a altas concentraciones de Cd.

Por otro lado, los valores de biomasa promedio para *Eichhornia crassipes* no presentaron diferencias

significativas entre tratamientos ($F=0,62$; $p=0,656$), lo que demuestra tolerancia a este metal pesado. En hojas la biomasa se presentó en un rango de 0,61-0,87 g y en raíces 0,52-1,12 g (Fig. 4).

Para *Limnocharis flava* la biomasa promedio fue de 0,35-0,60 g, 1,01-1,30 g y 0,30-0,22 g en hojas, tallos y raíces, respectivamente (Fig. 5). En esta especie tampoco se encontraron diferencias significativas en la biomasa de los distintos órganos para los distintos tratamientos ($p>0,05$).

Con respecto al índice de tolerancia (IT), en *Azolla* el más bajo (18,49%) se apreció en el tratamiento de 0,25 mg/L CdCl₂ y se observó una reducción proporcional a la concentración de Cd desde 0,5-2mg/L CdCl₂ con una correlación lineal de $R^2=0,92$ (Fig. 6). *E. crassipes* y *L. flava* también presentaron una disminución del IT a 0,25 mg/L CdCl₂ de 72,48% y 89,01%, respectivamente. Sin embargo, estas especies presentaron altos IT cercanos al 100% a mayores concentraciones de Cd, llegando a superar este valor en *E. crassipes* 123% a 2 mg/L CdCl₂ y *L. flava* 116% a 1 mg/L, lo que podría interpretarse como un estímulo en el crecimiento.

Capacidad de acumulación de Cd en los órganos de las plantas, factor de Bioconcentración y factor de transferencia

La mayor captación de Cd se observó en la biomasa de *Azolla* sp. (6136±25,28 mg/Kg Cd), raíces de *Eichhornia crassipes* (1482±368,41 mg/Kg Cd) y raíces de *Limnocharis flava* (817,3±100,7 mg/kg Cd).

Azolla sp. alcanza valores de 634,00±131,64 mg/kg Cd, 1628,54±239,88 mg/kg Cd, 6136,12±25,28 mg/kg Cd y 1040,39±142,90 mg/kg Cd a 0,25, 0,5, 1 y 2 mg/L CdCl₂, respectivamente (Fig. 7A). Las diferencias entre la acumulación de Cd a 1 y 2 mg/L CdCl₂ son estadísticamente significativas según la prueba de Kruskal-Wallis, demostrándose que la concentración máxima a la que se debe exponer esta especie es a 1 mg/L CdCl₂ ($H=3,86$; $p=0,049$) (Fig. 6A).

Similar que en *Azolla* sp., *Eichhornia crassipes* acumuló la mayor concentración de Cd al ser expuesta a 1 mg/L CdCl₂: 514,44±208,11 mg Cd/kg en hojas y 1482,66±368,41 mg Cd/kg en raíces (Fig.7B). Al ser expuestas a 2 mg/L, se apreció una tendencia a disminuir la acumulación en las raíces y hojas, sin embargo, las diferencias no fueron significativas según Anova de una vía y test de Tukey ($p>0,05$).

Limnocharis flava fue la especie que menos acumuló Cd, con un máximo de 3,15±3,51 mg/kg Cd en hojas y 817,3±112,2 mg/kg Cd en raíces (Fig. 7C). Es importante destacar que el Cd no fue detectable en las hojas de esta especie en 0,25 mg/L CdCl₂, por lo que pareciera presentar un mecanismo de exclusión a nivel de las raíces.

En cuanto al FBC, todas las especies presentaron valores mayores a 1 (Tabla 2). El valor superior de

FBC lo presentó *Azolla* sp. con 6136,13±25,28, seguida por *E. crassipes* con 2656,74±1429,10 y finalmente por *L. flava* con 1860±320. En las tres especies el FBC se redujo significativamente para los tratamientos de 2 mg/L CdCl₂ ($p<0,05$).

En *Azolla* hubo un incremento del FBC proporcional a la concentración de Cd, desde 0,25-1 mg/L CdCl₂ con una correlación lineal de $R^2=0,97$ y una correlación de Pearson de $r=0,98$, decayendo a los 2 mg/L CdCl₂ (Fig. 8A). El FBC de *E. crassipes* (Fig. 8B), contrario a el de *Azolla* sp., presentó una correlación de Pearson inversamente proporcional a la concentración de Cd $r=-0,92$, al igual que *L. flava* = -0,91 (Fig. 8C).

El FT no superó el valor de 1 para ninguna de las especies, por lo que no se las puede considerar como hiperacumuladoras (Tabla 2). El máximo valor de FT en *E. crassipes* fue de 0,34±0,07 a 1 mg/L CdCl₂ y el mínimo 0,19±0,06 a 0,25 mg/L CdCl₂, aunque las diferencias no son significativas entre los tratamientos ($p>0,05$). En *L. flava* el máximo valor de FT fue aún menor con 0.047±0.031 a 2 mg/L CdCl₂ y el mínimo 0.006±0.001 a 0,25 mg/L CdCl₂, por lo que se puede concluir que esta especie presenta una baja o casi nula transferencia de Cd de la raíz a las hojas.

Remoción de Cd por las especies *Azolla*, *Eichhornia crassipes* y *Limnocharis flava*

El mayor porcentaje de remoción de Cd se detectó en *E. crassipes* con porcentajes de 100±0,00% en el tratamiento a 0,25 mg/L (Fig. 7). En segundo lugar, *Azolla* sp. removió 46,33±1,34% de Cd y finalmente *L. flava* eliminó sólo 30,98±5,29%. Aunque se logró disminuir las concentraciones de Cd en los tratamientos con *Azolla* sp. y *L. flava*, los valores de Cd en la solución siguen superando los LMP permitidos de 0,001 mg/L según el TULSMA y la OMS para agua de consumo humano. Sólo *E. crassipes* logró reducir la concentración de Cd a 0 mg/L en el tratamiento con la mínima concentración de Cd (0,25 mg/L CdCl₂). El porcentaje de remoción de Cd por *Azolla* sp. fue 46,33±1,34%, a 0,25 mg/L, reduciéndose este a mayores concentraciones de Cd en la solución: 29,22±3,33% y 30,00±2,50% a 0,5 y 1 mg/L CdCl₂ hasta llegar a 0% a 2 mg/L CdCl₂. Al realizar un análisis de correlación de Pearson se observó una relación inversamente proporcional entre la concentración de Cd en la solución y su porcentaje de remoción, por lo que, a mayor concentración de Cd en el medio, menor eficiencia presentará la planta para remover el metal ($r=-0,83$; $p=0,001$).

Por otro lado, *E. crassipes* removió el 100% del Cd en la solución a 0,25 mg/L CdCl₂, a 0,50 mg/L CdCl₂ se redujo el porcentaje a 95±2,11%, 70,73±28,44% y 76,4±17,56% a 1 y 2 mg/L CdCl₂, respectivamente. *L. flava* presentó la menor tasa de remoción de todas las especies estudiadas, con porcentajes de 29,25±9,01%, 30,98±5,29%, y 0% a 0,5, 1 y 2 mg/L CdCl₂.

Finalmente, para la interpretación integral de los datos se aplicó estadística multivariada donde se

Plantas en el área de estudio



Reproducción de las especies para los
bioensayos

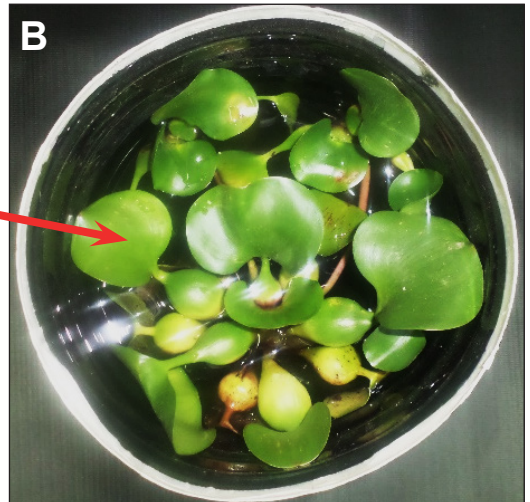
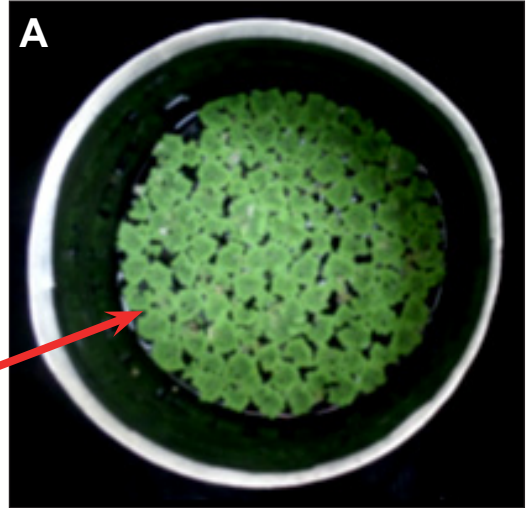


Figura 2. Especies de plantas reportadas como hiperacumuladoras de Cd halladas en el área de estudio. A. *Azolla* sp., B. *Eichhornia crassipes*, C. *Limncharis flava*.

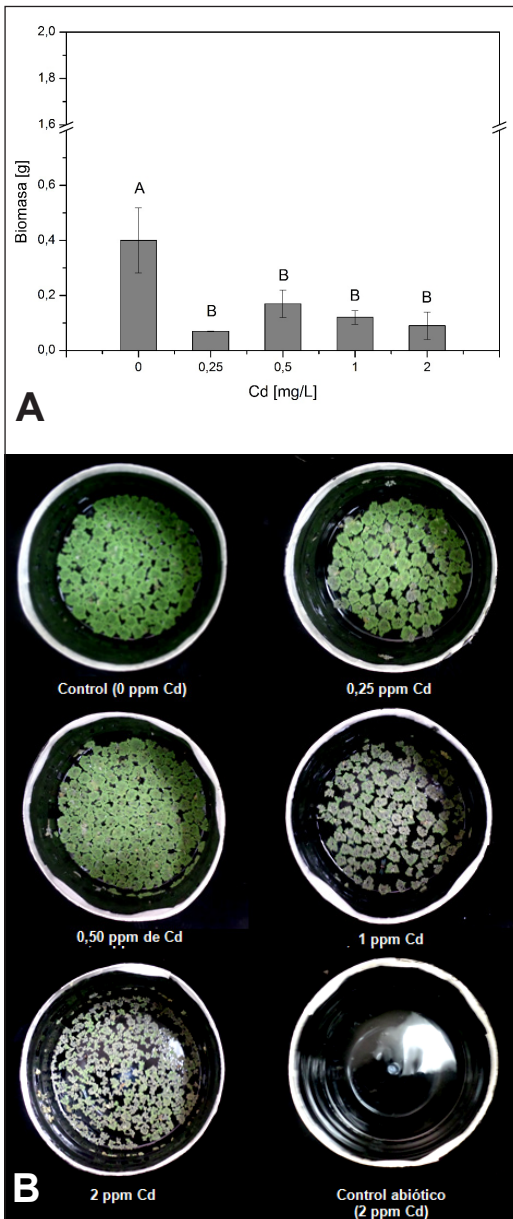


Figura 3. A. Efectos de la exposición al Cd sobre la biomasa de *Azolla sp.* expuesta durante 7 días a diferentes concentraciones de Cd (0, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/L). Los resultados se muestran como medias±desviación estándar (n=3). Letras iguales señalan que no hay diferencias estadísticamente significativas según Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). B. Apariencia de los helechos a los 7 días donde se observa a partir de 1 ppm clorosis y necrosis, a 2 ppm muerte; también se observa una coloración púrpura en las hojas.

generó un dendrograma de correlación para estudiar la relación entre las variables (Fig. 9) y se llegó a las siguientes conclusiones: Existe una correlación entre el FBC y el porcentaje de remoción en *E. crassipes* y *L. flava*. También se apreció relación entre la

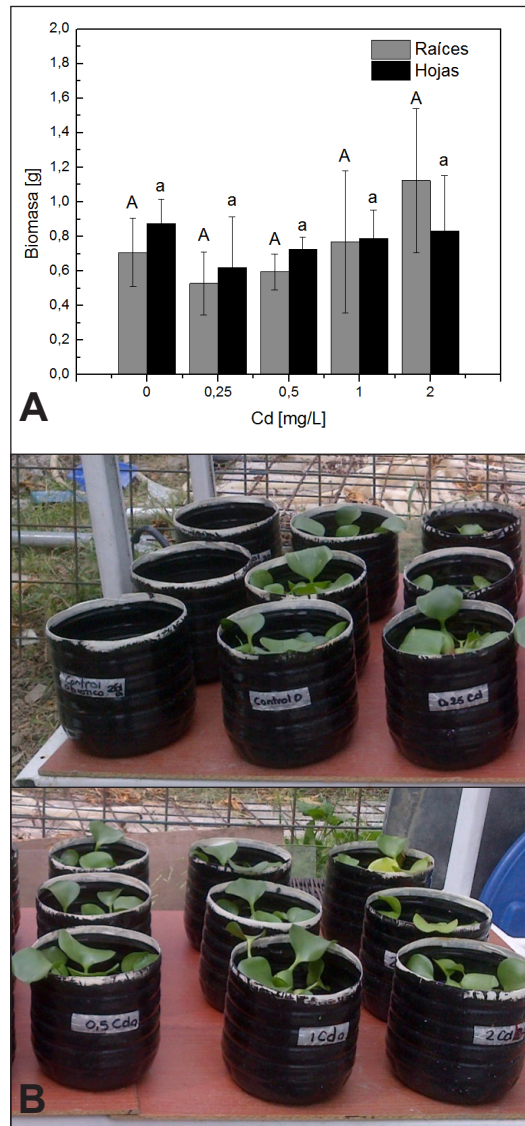


Figura 4. A. Biomasa de *Eichhornia crassipes* expuesta durante 7 días a diferentes concentraciones de Cd (0, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/L). Los resultados se muestran como medias±desviación estándar (n=3). Letras iguales señalan que no hay diferencias estadísticamente significativas según Anova de 1-vía ($p < 0.05$) y test a posteriori de Tukey. B. Foto de las plantas a los 7 días de exposición al Cd.

concentración de Cd en la solución y el Cd acumulado en las raíces para ambas especies. Finalmente, en *E. crassipes* el FT se correlaciona con la concentración de Cd en las hojas y en *L. flava* la relación está dada principalmente por el Cd acumulado en los tallos.

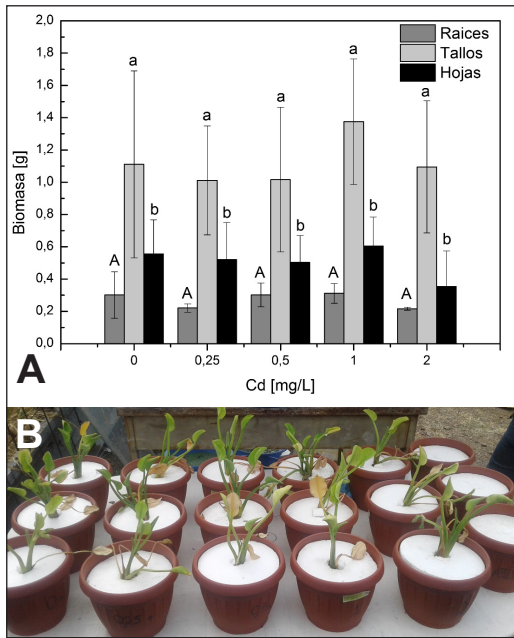


Figura 5. A. Biomasa de *Limnocharis flava* expuesta durante 7 días a diferentes concentraciones de Cd (0, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/L). Los resultados se muestran como medias±desviación estándar (n=3). Letras iguales señalan que no hay diferencias estadísticamente significativas según Anova de 1-vía (p<0.05) y test a posteriori de Tukey. **B.** Foto de las plantas a los 7 días de exposición al Cd., se observa hojas senescentes en todos los tratamientos incluyendo el control.

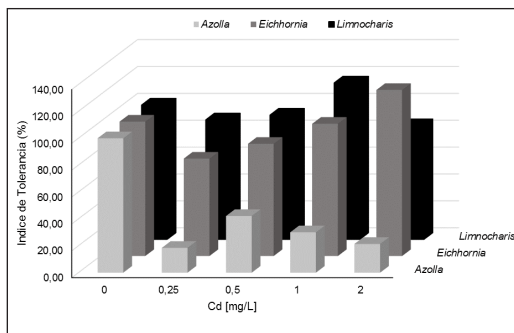


Figura 6. Índice de tolerancia de *Azolla* sp., *Eichhornia crassipes* y *Limnocharis flava* expuestas a distintas concentraciones de Cd durante 7 días.

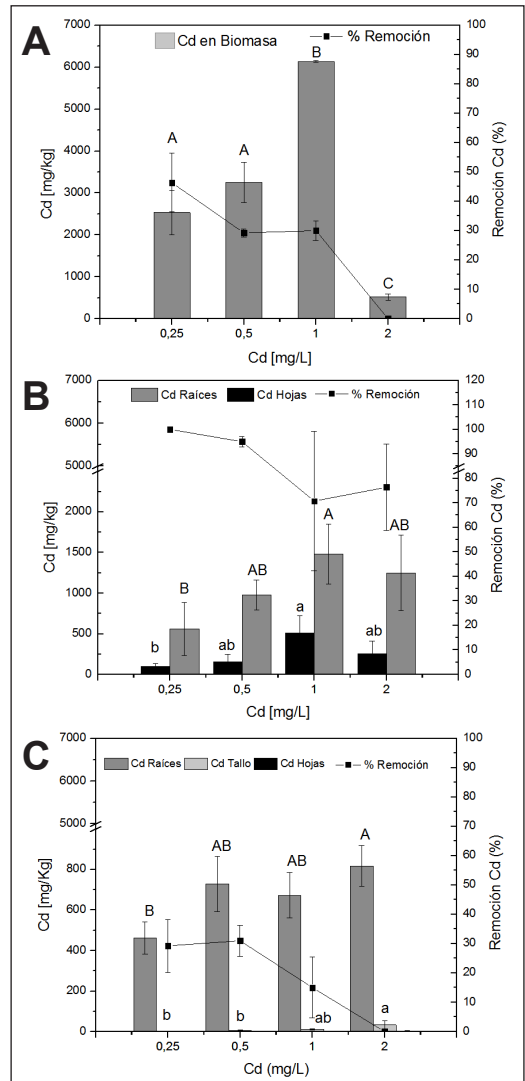


Figura 7. Acumulación de Cd (barras) en raíces, tallos y hojas raíces e inflorescencias de plantas de **A.** *Azolla* sp. **B.** *Eichhornia crassipes* y **C.** *Limnocharis flava*, expuestas durante 7 días a diferentes concentraciones de Cd (0, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/L) en cultivo hidropónico. En puntos se muestra el porcentaje de remoción de Cd en la solución nutritiva en el tiempo. Las barras y los puntos representan la media±desviación estándar (n=3). Letras iguales señalan que no hay diferencias estadísticamente significativas en comparación a la concentración de Cd en cada órgano según Kruskal-Wallis o ANOVA de 1-vía y test de Tukey (p<0.05).

Discusión

En el área de estudio se hallaron 3 especies de plantas con potencial para remover Cd de arrozales. De estas especies, *E. crassipes* se utilizó como control positivo por estar ampliamente reportada literatura como fitoextractora de metales pesados en agua desde los

años 70 y por ser utilizada en tratamientos de aguas servidas. *E. crassipes* fue propuesta por Rosas et al. (1984) como un buen indicador de Cd en agua por su capacidad de acumular este metal de 10^3 a 10^4 veces por encima de su nivel en el agua. En el presente trabajo se registró un valor de 1483 ± 368 mg/kg de Cd en las raíces, cercano al valor hallado por Rosas et al., (1984) de 1377 mg/kg de Cd en raíces en plantas

Tabla 2. Factor de Bioconcentración (FBC) y Factor de Transferencia (FT) de las plantas *Azolla Ksp.*, *Eichhornia crassipes* y *Limnocharis flava* expuestas a distintas concentraciones de Cd por 7 días. Letras iguales señalan que no hay diferencias estadísticamente significativas según Anova de 1-vía ($p < 0.05$) y test a posteriori de Tukey.

Cd [mg/L]	FBC Factor de Bioconcentración	FT Factor de Transferencia
<i>Azolla caroliniana</i>		
0,25	2536,02±526,58 ^B	-
0,5	3257,08±479,77 ^B	-
1	6136,13±25,28 ^A	-
2	520,20±71,45 ^C	-
<i>Eichhornia crassipes</i>		
0,25	2656,74±1429,10 ^A	0,19±0,06 ^A
0,5	2282,27±426,39 ^A	0,17±0,10 ^A
1	1997,12±565,56 ^A	0,34±0,07 ^A
2	754,35±294,13 ^A	0,20±0,07 ^A
<i>Limnocharis flava</i>		
0,25	1860±320 ^A	0.006±0.001 ^A
0,5	1471±279 ^A	0.009±0.003 ^A
1	686.5±114.9 ^B	0.020±0.002 ^A
2	427.4±48.1 ^B	0.047±0.031 ^A

expuestas a 1 ppm de Cd. *E. crassipes* acumuló la mayor concentración de Cd en las raíces, por lo que este órgano puede ser utilizado para el monitoreo de metales pesados. Los resultados del presente trabajo coinciden con los otros autores que han señalado que esta especie acumula el mayor porcentaje del metales en sus raíces (Rosas et al., 1984; Carrión et al., 2012; Olivares-Rieumont et al., 2007). De aquí que esta especie puede ser utilizada también para monitorear la contaminación por Cd en los arrozales.

Además, *E. crassipes* fue la especie que removió la mayor concentración de Cd de la solución, eliminando en un 100% el metal pesado cuando se encuentra a bajas concentraciones (0,25 mg/kg CdCl₂). Probablemente esta eficiencia en la remoción se debe a su alta tasa de crecimiento y a sus raíces expandidas. También se ha descrito que *E. crassipes* posee altos contenidos de celulosa y de grupos funcionales carboxilos (COO-), hidroxilos (-OH-), amino (-NH₂) y sulfhidrilo (-SH), responsables de su capacidad de adsorción de metales pesados (Patel, 2012). Otros trabajos también han reportado altos porcentajes de remoción de Cd para *E. crassipes*. Según Maine et al. (2001) la capacidad de remoción de Cd de es de 74% en 24 h, Mishra & Tripathi (2008) encontraron una reducción de Cd del 92% en 14 días y de 81% al exponerla a 1 ppm de Cd por 12 días.

En cuanto a los efectos tóxicos del Cd, *E. crassipes* no presentó disminución de su crecimiento. Estos

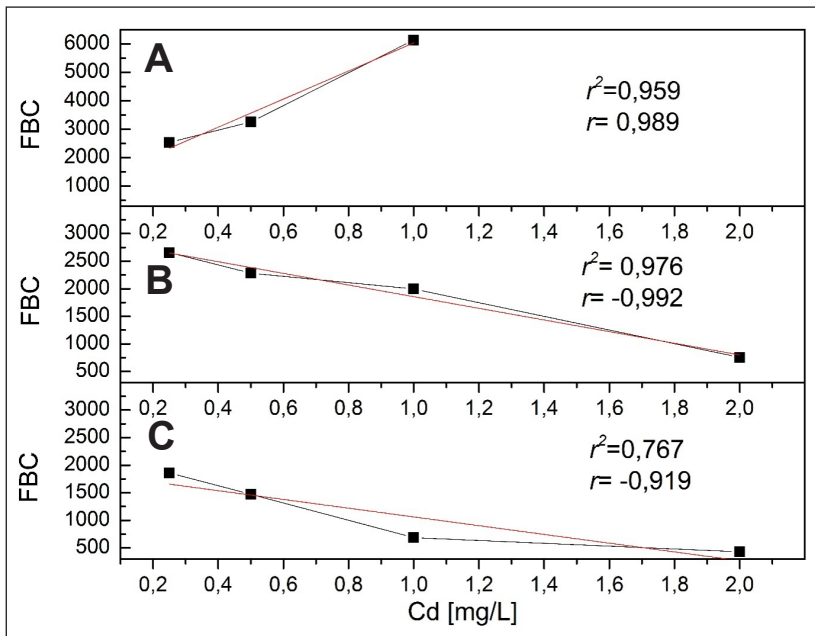


Figura 8. Regresión lineal y correlación de Pearson entre el Factor de Bioconcentración (FBC) y las diferentes concentraciones de Cd (0, 0,25, 0,5, 1 y 2 mg/L) para las especies A. *Azolla sp.* B. *Eichhornia crassipes* y C. *Limnocharis flava*.

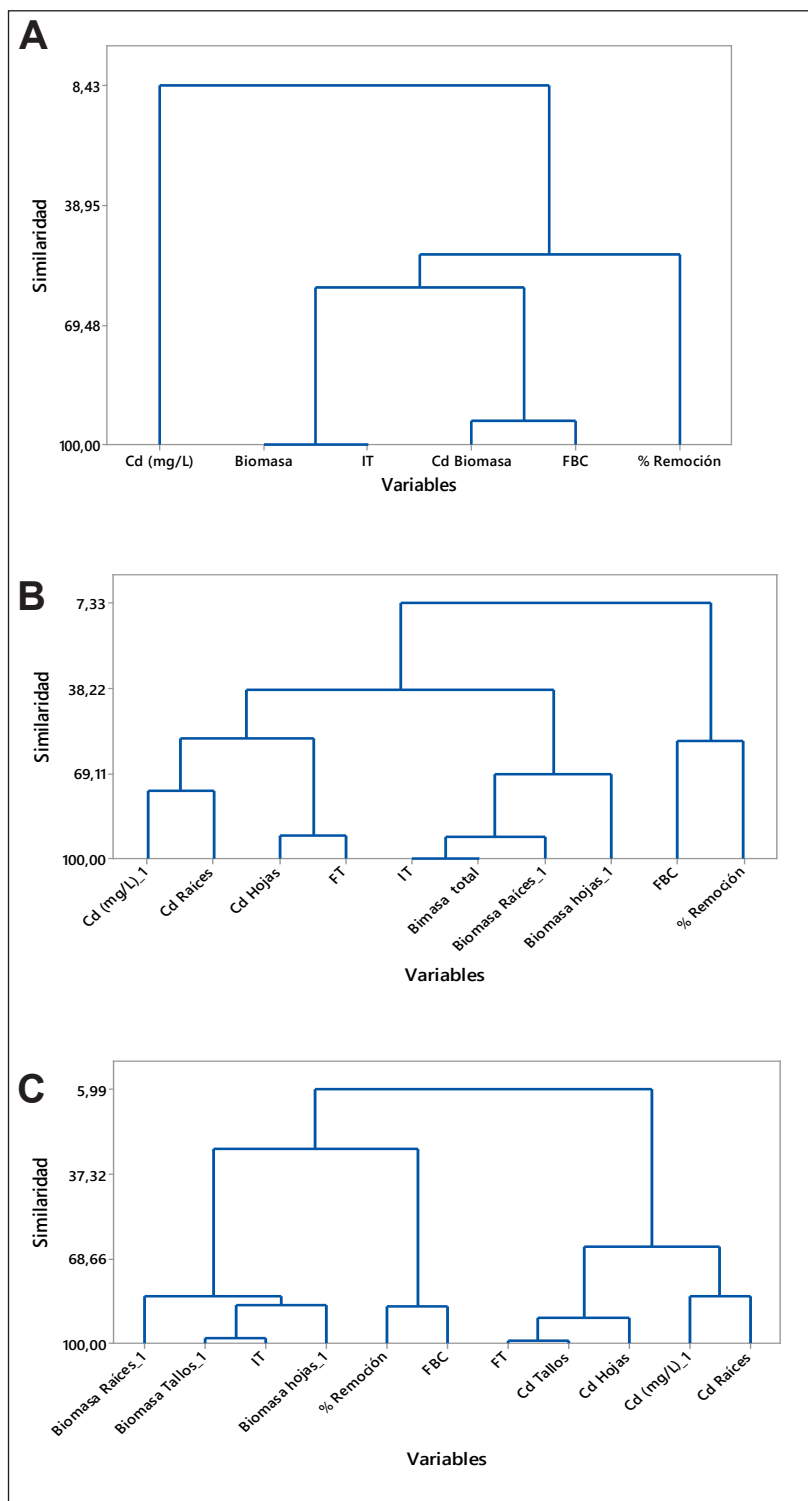


Figura 9. Dendrograma de correlación entre las variables Biomasa, Índice de Tolerancia (IT), concentración de Cd en raíces (Cd Raíces), tallos (Cd Tallos), hojas (Cd Hojas); Factor de Bioconcentración (FBC), Factor de transferencia (FT), porcentaje de remoción y Cd en la solución (Cd(mg/L) para: A. *Azolla* sp., B. *Eichhornia crassipes*, C. *Limnocharis flava*.

resultados coinciden con los de otros autores quienes señalan que esta especie es muy tolerante al Cd. Sin embargo, en *E. crassipes* se observó clorosis en hojas jóvenes en el tratamiento 2 mg /L CdCl₂. La clorosis se ha descrito como un biomarcador de toxicidad por Cd en las plantas y se presenta como consecuencia de la inhibición de la fotosíntesis por la interferencia que genera el Cd en la síntesis de clorofila (Pernía et al., 2008; Dalla Vecchia et al., 2005; Mishra et al., 2006).

Otra evidencia del efecto del Cd sobre *E. crassipes* fue la disminución en su FBC, a medida que incrementó la concentración del metal pesado en el medio y que se correlacionó con la disminución en el porcentaje de remoción de Cd en la solución. Al igual que nosotros, Rosas et al. (1981) observaron un menor porcentaje de remoción a altas concentraciones de Cd, lo que podría deberse, por un lado, a una reducción en la tasa de transpiración como consecuencia del cierre estomático que induce este metal, o al daño a nivel genético e inhibición de la división celular que se ha registrado para esta especie a partir de 1 mg/L Cd.

La desventaja de *E. crassipes* es que se ha considerado como una de las 100 especies invasoras más agresivas según la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza y una de las 10 peores malezas a nivel mundial (Ruiz et al., 2008). Esta especie reduce el contenido de oxígeno del agua ya que genera eutrofización, destruye la biodiversidad nativa por competencia, interfiere en la cadena trófica y es refugio de algunos vectores de enfermedades y patógenos (Patel, 2012). A nivel de la agricultura, bloquea los canales de irrigación y obstruye el flujo de agua a las cosechas, por lo que no se puede recomendar su uso en las arroceras.

Por otro lado, *Azolla* sp. es un helecho acuático con alta velocidad de crecimiento cuya combinación con cultivos de arroz es una práctica que se ha llevado a cabo desde hace más de 100 años, por su efecto beneficioso sobre los arrozales (Castro et al., 2002). En Ecuador ha sido aplicada en el área de Daule por el grupo de investigación del Dr. Mariano Montaña, con excelentes resultados (Montaña, com. pers).

De todas las especies estudiadas en el presente trabajo, *Azolla* sp. fue la que acumuló las mayores concentraciones de Cd en su biomasa. Se ha descrito que la unión inicial de los metales a la *Azolla* sp. se da por la unión a grupos cargados negativamente en la pared celular, carboxilos, fosfatos, pectinas y celulosa (Ganji et al., 2005). En este trabajo, la concentración de Cd máxima en *Azolla* sp. fue de 6000 mg/kg, esta es mucho mayor a la reportada para *Azolla caroliniana* de 165 mg/kg Cd y por Tan et al. (2011) de 1364 mg/ Cd. (Pandey, 2012).

Azolla sp. acumula grandes concentraciones de Cd y presenta varias características apropiadas, debido a que es de fácil reproducción, posee una alta productividad de biomasa, crece en numerosos ambientes y es capaz de fijar nitrógeno atmosférico

gracias a la presencia de su simbiote *Anabaena azollae* (Peters, 1984). Además, la *Azolla* se ha utilizado como biofertilizante para cultivos de arroz, debido a que incrementa el contenido de nitrógeno, la materia orgánica y el potasio en el suelo e incrementa la producción de granos (Tung y Shen, 1985; Castro et al., 2003). Además, ha demostrado su eficiencia en la adsorción de arsénico y otros metales como cromo hexavalente y trivalente, mercurio, zinc, níquel, plomo y otros de soluciones acuosas y efluentes contaminados (Ganji et al., 2005; Thayaparan et al., 2013; Sufian et al., 2013). También se ha descrito que reduce la pérdida de agua y nitrógeno y reduce la proliferación de mosquitos en los sembríos de arroz (Tung & Shen 1985).

La desventaja de *Azolla* sp. es que no tolera grandes concentraciones de Cd, lo que se evidenció con una disminución en la biomasa de los helechos expuestos al metal pesado. Esta reducción en el crecimiento se ha descrito como uno de los efectos tóxicos más comunes del Cd en las plantas, debido a que afecta la fotosíntesis y la toma de nutrientes (Castrillo et al., 2007; Pernía et al., 2008). En el presente trabajo solo *Azolla* sp. fue afectada en su crecimiento por el Cd, éstos resultados concuerdan con los obtenidos por El-all et al. (2011), quienes observaron una fuerte reducción en el crecimiento de esta especie al exponerla a 2 ppm de Cd y Gaur et al. (1994), quienes determinaron un EC₅₀ de 0,8 µM Cd para *Azolla pinnata*.

Otro hecho importante, es que en *Azolla* sp. se apreció una fuerte reducción en el crecimiento a 0,25 mg/L CdCl₂, lo cual podría deberse a que a bajas concentraciones de Cd no se habían activado los mecanismos de detoxificación tales como la producción de fitoquelatinas, antocianinas, incremento en la concentración de tioles y prolina, descritos por algunos autores (Dai et al., 2012; Pernía et al., 2008). La disminución a 2 mg/L podría ser atribuida directamente a la toxicidad del Cd. Otro aspecto que se observó fue una coloración púrpura en las hojas de plantas expuestas a altas concentraciones de Cd (Fig. 2B). Esta coloración podría deberse a la generación de antocianinas como respuesta al estrés oxidativo generado por el Cd. En *Azolla imbricata* se describió un incremento en la concentración de antocianinas como mecanismo de detoxificación de Cd (Dai et al., 2012).

Aunque esta especie acumuló altas concentraciones de Cd, la tasa de remoción en el agua no superó el 50%. Este bajo porcentaje de remoción podría deberse a la poca biomasa que generó el helecho. Otros autores han encontrado mayores porcentajes de remoción de Cd, como es el caso de Bharthi y Banerjee (2012) quienes reportaron una reducción de Cd de agua servida en una mina de carbón de 61,7% por *Azolla pinnata* (Bharti y Banerjee, 2012).

En líneas generales, la biomasa total mayor se obtuvo en *L. flava* (1,66-2,29 g) seguida por *E. crassipes*

con valores de 1,14-1,58 g; en *Azolla* sp. los valores fueron muy bajos (0,07-0,16 g), esto explica el bajo porcentaje de remoción observado para esta especie, aun cuando presenta el mayor FBC.

Los resultados para *L. flava* dieron contrarios a lo reportado por otros autores, quienes la sugirieron como planta hiperacumuladora de Cd y en el presente trabajo fue la menos eficiente en remover el Cd y su tasa de transferencia al vástago fue muy baja. Abhilash et al. (2009), sugieren el uso de *L. flava* como fitofiltradora de Cd por presentar un FBC de 934,86 en 30 días de exposición al Cd, un FT mayor a 1 y por presentar una tasa de crecimiento rápida. Sin embargo, en el presente trabajo el FBC fue el doble al reportado por Abhilash et al. (2009) y el FT no superó el valor 1. Es probable que la diferencia en los resultados se daba a los días de exposición ya que ellos trabajaron con 30 días y nosotros con solo 7 días. Además, Abhilash et al. utilizaron pH 7 en sus cultivos y nosotros pH 5,5 para imitar las condiciones de los arrozales de Daule, por lo que el metal pesado se encontraba más biodisponible y es por ello que en este estudio las plantas deben haber acumulado una mayor concentración en las raíces.

Syukor et al. (2015), indican que esta especie es capaz de remover 44% del Cd en una solución en 13 días, en nuestro estudio *L. flava* removió sólo el 30% de Cd de la solución. Sin embargo, es tolerante al Cd ya que su biomasa no se vio afectada, éstos resultados coinciden con Abhilash et al. (2009), quienes incluso observaron un estímulo en el crecimiento a bajas concentraciones de Cd.

Entre las desventajas de *L. flava* podemos citar que ha sido considerada como una maleza en los cultivos de arroz en Ecuador (INIAP, 2007). Además, puede llegar a ser dominante, en las zonas de cultivo bajo riego adquiere un desarrollo significativo en tamaño y frondosidad, crece en canales de desagüe de las parcelas y compete por espacio y nutrientes con las plantas de arroz (Zambrano, 1974; CIAT, 1983).

De las especies estudiadas, las que presentaron un mayor índice de tolerancia fueron *E. crassipes* y *L. flava*, se observó que se correlaciona con el hecho de no verse afectado el crecimiento en estas especies, por lo que probablemente presente mecanismos de tolerancia tales como la unión del Cd a las paredes celulares cargadas negativamente o a la presencia de fitoquelatinas en estas especies.

Según Brooks (1998), para que una especie se considere hiperacumuladora de Cd debe acumular más de 100 mg/kg de Cd en su biomasa, debe tener un FBC y un FT mayores a 1. El FBC de las tres especies fue mayor a 1; sin embargo, el FT no fue mayor a 1, por lo que bajo nuestras condiciones experimentales no pueden ser consideradas plantas hiperacumuladoras de Cd.

Otro aspecto importante que se observó fue que, a mayor concentración de Cd en la solución, menor

tasa de remoción. En los análisis de correlación se observó dependencia entre la remoción de Cd y el FBC. Es probable que se deba a la reducción en el FBC por parte de la planta y este a su vez podría estar relacionado con una disminución en la tasa de transpiración como consecuencia del cierre estomático que ocurre a consecuencia de la entrada del Cd en las células oclusivas de los estomas donde sustituye al Ca.

En Ecuador estas especies pueden ser utilizadas como candidatas a bioindicadoras de contaminación por metales pesados en los arrozales o como fitorremediadoras de Cd en medios que no superen 1 mg/L de Cd. Se propone una estrategia para la mitigación de la contaminación por Cd en el cantón Daule mediante el co-cultivo de *L. flava* y *Azolla* sp., debido a que crecen bien en los arrozales y podrían utilizarse en sinergia, donde *L. flava* podría acumular Cd del suelo y *Azolla* sp. del agua, de esta manera competirían con las plantas de *Oryza sativa* por el Cd. Se recomienda realizarse bajo estricta supervisión para evitar que las plantas se conviertan en invasoras.

Una vez extraído el metal pesado por las plantas, estas deben ser retiradas de las zonas contaminadas, incineradas e inmovilizadas, para lo cual podrían ser utilizadas en la fabricación de cemento o asfalto para las carreteras o bien ser acumuladas y guardadas en un sitio seguro.

Otro aspecto importante es que algunos autores han sugerido el uso de estas especies invasoras como comida para los animales de granja y peces (Ruiz et al., 2008; Zambrano 1974). De igual forma, *L. flava* ha sido consumida por personas de bajos recursos (Rachmadiarti et al., 2012), por esto es importante hacer un llamado a la población a no consumir estas plantas ni darlas de comer a los animales, previo a un análisis de metales pesados para salvaguardar la seguridad alimenticia. En el cantón Daule se recomienda tratar estas plantas como residuos peligrosos, debido a que en ejemplares procedentes de la zona se registraron valores superiores a los recomendados por la FAO/OMS (2000) para alimentos de origen vegetal (0,05 mg/Kg Cd).

Conclusiones

Azolla sp., *Eichhornia crassipes* y *Limnocharis flava* son plantas fitoextractoras de Cd asociadas a las áreas de producción de arroz en el cantón Daule, en la provincia del Guayas, Ecuador. Su potencial para acumular grandes concentraciones de Cd está determinado en el orden: *Azolla* sp. > *Eichhornia crassipes* > *Limnocharis flava*, y para remover el metal en la solución, en el orden: *Eichhornia crassipes* > *Azolla* sp. > *Limnocharis flava*. Aunque las tres especies acumularon valores elevados de Cd en su biomasa y su FBC fue mayor a 1 presentando un gran potencial como fitoextractoras, su FT fue menor a 1, por lo que bajo nuestras condiciones experimentales no pueden ser consideradas plantas hiperacumuladoras de Cd.

Se propone una estrategia para la mitigación de la contaminación por Cd en el cantón Daule mediante el uso de la sinergia de *Azolla* sp. y *Limnocharis flava* en co-cultivo con *Oryza sativa* bajo estricta supervisión, para evitar que se conviertan en invasoras. No se recomienda el uso de *Eichhornia crassipes* en cultivos de arroz en el área, debido a que presenta más potenciales desventajas que ventajas.

Referencias

- Abhilash, P. C., N. Singh, V. P. Syllas, B. Ajay Kumar, J. C. Mathew, R. Satheesh y A. P. Thomas. 2008. Eco-distribution mapping of invasive weed *Limnocharis flava* (L.) Buchenau using geographical information system: Implications for containment and integrated weed management for ecosystem conservation. *Taiwania* 53(1):30-41.
- Abhilash, P. C., V. C. Pandey, P. Srivastava, P. S. Rakesh, S. Chandran, N. Singh y A. P. Thomas. 2009. Phytofiltration of cadmium from water by *Limnocharis flava* (L.) Buchenau grown in free-floating culture system. *Journal of Hazardous Materials* 170: 791-97.
- Aguilar, D., D. Andrade, D. Alava, J. Burbano, M. Díaz, A. L. Garcés, W. Jiménez, D. Leiva, V. Loayza, W. Muyulema, P. Jeréz, V. Ruiz, B. Simbaña y R. Yépez. 2015. Estimación de superficie sembrada de arroz (*Oryza sativa* L.) y maíz amarillo duro (*Zea mays* L.) en las épocas de invierno y verano año 2015, en las provincias de Manabí, Los Ríos, Guayas, Santa Elena, Loja y El Oro. Quito.
- Agunbiade, Foluso O., Bamidele I. Olu-Owolabi y Kayode O. Adebowale. 2009. Phytoremediation potential of *Eichhornia crassipes* in metal-contaminated coastal water. *Bioresource Technology* 100:4521-4526.
- Anning, A. K., P. E. Korsah y P. Addo-Fordjour. 2013. Phytoremediation of wastewater with *Limnocharis flava*, *Thalia geniculata* and *Typha latifolia* in constructed wetlands. *Int. J. Phytoremediation* 15:452-464.
- Bharti, Sandhya y K. Banerjee. 2012. Phytoremediation of the coalmine effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 81:36-42.
- Brooks, R. R. 1998. *Plants that hyperaccumulate heavy metals. Their role in phytoremediation, microbiology archaeology, mineral exploration and phytomining*. CABI. Wallingford, UK. 380 p.
- Carrión, C., C. Ponce de León, S. Cram, I. Sommer, M. Hernández y C. Vanegas. 2012. Aprovechamiento potencial del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en Xochimilco para fitorremediación de metales. *Agrociencia* 46: 609-620.
- Castrillo, M., B. Pernía, J. Alvarado y J. Domínguez. 2007. Response to cadmium exposure in crop and weed plants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 146: S255-266.
- Castrillo, M., B. Pernía, A. De Sousa y R. Reyes. 2012. Utilization of different aspects associated with cadmium tolerance in plants to compare sensitive and bioindicator species. En: N. A. Anjum, M. E. Pereira, I. Ahmad, A. C. Duarte, S. Umar, N. A. Khan (eds.). *Phytotechnologies: Remediation of Environmental Contaminants*, cap. 24:427-440.
- Castro, R., R. Novo y R. I. Castro. 2002. Uso del género *Azolla* como biofertilizante en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales* 23:5-10.
- Castro, R., R. Novo y R. I. Castro. 2003. Influence of *Azolla-Anabaena* symbiosis on rice (*Oryza sativa* L.) crop as a nutritional alternative. *Cultivos Tropicales* 24:77-82.
- Chávez, E., Z. L. He, P. J. Stoffella, R. S. Mylavaram, Y. C. Li, B. Moyano y V. C. Baligar. 2015. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment* 533:205-214.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1983. *Principales malezas en el cultivo del arroz en América Latina: Guía de Estudio para ser usada como complemento de la unidad audiotutorial sobre el mismo tema*. Contenido científico: J. González. Producción R. Zelaya, O. Arregocés. Colaboración: E. Escobar. Cali, Colombia. CIAT. 48 p.
- Clemens, S., M. G. Aarts, S. Thomine y N. Verbruggen. 2013. Plant science: The key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant Sci.* 18:92-99.
- Dai, L.-P., X.-J. Dong y H. H. Ma. 2012. Molecular mechanism for cadmium-induced anthocyanin accumulation in *Azolla imbricata*. *Chemosphere* 87:319-325.
- El-all, A.B., E. M. Aref y H. A. M. Hassanein. 2011. Bioaccumulation of heavy metals by the water fern *Azolla pinnata*. *Egypt. J. Agric. Res.* 89:1261-1276.
- FAO y OMS. 2000. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius, 3-7. file:///C:/Users/IIRN/Downloads/al0324As.pdf.
- Félix, Imelda, F. Mite, M. Carrillo y M. Pino. 1986. Avances de investigación del proyecto Determinación de metales contaminantes en cultivos de exportación y su repercusión sobre la calidad de los mismos. En: *VIII Congreso Ecuatoriano de La Ciencia Del Suelo*, 1-8.
- Ganji, M. T., M. Khosravi y R. Rakhshae. 2005. Biosorption of Pb, Cd, Cu and Zn from the wastewater by treated *Azolla*. *Int. J. Environ. Sci. Tech* 1(4):265-71.
- Gaur, J., N. Noraho y Y. Chauhan. 1994. Relationship between heavy metal accumulation and toxicity in *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. and *Azolla pinnata* R. Br. *Aquatic Botany* 49:183-92.
- INIAP. 2007. *Manual del cultivo de arroz*. Guayaquil: INIAP Archivo Histórico. <https://books.google.com/books?id=IxoZQAAMAAJ&pgis=1>.
- Keller, C. y D. Hammer. 2004. Metal availability and soil toxicity after repeated croppings of *Thlaspi caerulescens* in metal contaminated soils. *Environmental Pollution* 131(2):243-54.
- Khan, A. G., C. Kuek, T. M. Chaudhry, C. S. Khoo y W. J. Hayes. 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41(1-2):197-207.
- Liu, Danqing, Chunhua Zhang, Xue Chen, Yazhou Yang, Shu Wang, Yujiao Li, Hao Hu, Ying Ge y W. Cheng. 2013. Effects of pH, Fe, and Cd on the uptake of Fe²⁺ and Cd²⁺ by rice. *Environmental Science and Pollution Research* 20(12):8947-54.
- Mahamadi, C. 2012. Water hyacinth as a biosorbent: a review. *African Journal of Environmental Science and Technology* 5(13):1137-45.
- Maine, A., V. Duarte y L. Sun. 2001. Cadmium uptake by floating macrophytes 2. *Water Res.* 35(11):2629-34.
- Mishra, S., S. Srivastava, R. Tripathi, R. Govindarajan, S. Kuriakose y M. Prasad. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale* 44(1):25-37.
- Mishra, Virendra y B. Tripathi. 2008. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Biore* 99:7091-97.
- Mite, F., M. Carrillo y W. Durango. 2010. Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelo y agua en Ecuador. En: *XII Congreso Ecuatoriano de La Ciencia Del Suelo XII Congreso Ecuatoriano de La Ciencia Del Suelo*, 17-19.
- Muñoz, J., B. Pernía, M. Mero, E. Larreta, Á. Benavides, L. Ramírez-Moreira, J. Zambrano, et al. 2016. "Determinación de cadmio y plomo en plantas de arroz y suelos de Daule y Nobol. En: *2do. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología UTMACH*. Machala.
- Olivares-Rieumont, S., L. Lima, D. De La Rosa, D. W. Graham, I. Columbie, J. L. Santana y M. J. Sánchez. 2007. Water Hyacinths (*Eichhornia crassipes*) as indicators of heavy

- metal impact of a large landfill on the Almendares river near Havana, Cuba. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79(6):583-87.
- Pandey, Vimal Chandra. 2012. Phytoremediation of heavy metals from Fly Ash Pond by *Azolla caroliniana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 82. Elsevier: 8-12.
- Patel, S. 2012. Threats, management and envisaged of aquatic weed *Eichhornia crassipes*: an overview. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 11(3):249-59.
- Pernía, B., A. D. E. Sousa, R. Reyes y M. Castrillo. 2008. Biomarcadores de contaminación por cadmio en plantas. *Interciencia* 33:112-19.
- Peters, G. A. 1984. *Azolla-Anabaena* symbioses: basic biology, use, and prospects for the future. *Developments in Plant and Soil Sciences*, 1-14.
- Pozo, W., T. Sanfelio y G. Carrera. 2011. Metales pesados en humedales de arroz en la cuenca baja del río Guayas. *Maskana* 2(1):17-30.
- Prefectura del Guayas. 2016. Provincia del Guayas.
- Rachmadiarti, F., L. A. Soehono, W. H. Utomo, B. Yanuwiyadi y H. Fallowfield. 2012. Resistance of yellow velvetleaf (*Limncharis flava* (L.) Buch.) exposed to lead. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences* 2(6):210-15.
- Ramírez, N., B. Pernía, M. Mero, E. Larreta, A. Noboa-Cárdenas, L. Ramírez-Moreira, D. López, et al. 2016. *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1828) como bioindicador de la presencia de cadmio en el río Guayas, Daule y Babahoyo. *Rev. Cient. Cien. Nat. Ambien.* 10(1):19-28.
- Rosas, I., M. Carbajal, S. Gómez-Arrollo, R. Belmont y R. Villalobos. 1984. Cytogenetic effects of cadmium accumulation hyacinth on water (*Eichhornia crassipes*). *Environmental Reseach* 395:386-95.
- Ruiz, T., E. Martín, G. Lorenzo, E. Albano, R. Morán y J. M. Sánchez. 2008. The water hyacinth, *Eichhornia crassipes*: an invasive plant in the Guadiana river basin (Spain). *Aquatic Invasions* 3(1):42-53.
- Sela, M., E. Tel-Or, E. Fritz y A. Huttermann. 1988. Localization and toxic effects of cadmium, copper and uranium in *Azolla*. *Plant Physiology* 88:30-36. doi:10.1104/pp.88.1.30.
- Sharma, R. K. y G. Archana. 2016. Cadmium minimization in food crops by cadmium resistant plant growth promoting Rhizobacteria. *Applied Soil Ecology* 107. Elsevier B.V.: 66-78. doi:10.1016/j.apsoil.2016.05.009.
- Sufian, J., A. Golchin, A. Avanes y S. Moradi. 2013. Potentials of *Azolla* (*Azolla caroliniana*) for uptake of arsenic from contaminated waters with different levels of salinity. *IJACS* 6(12):778-83.
- Sytar, Oksana, M. Brestic, N. Taran y M. Zivcak. 2016. *Plants used for biomonitoring and phytoremediation of trace elements in soil and water*, chapter 14. En: *Plant Metal Interaction*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-803158-2.00014-X.
- Syukor, A. R. Abdul, S. Sulaiman, N. Islam Siddique, A. W. Zularisam y M. I. M. Said. 2015. Integration of phytogreen for heavy metal removal from wastewater. *Journal of Cleaner Production* (Accepted). Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.jclepro.2015.10.103.
- Tan, Cai-yun, Xiao-quan Shan, Guo-zhong Xu, Yu-man Lin y Zu-liang Chen. 2011. Phytoaccumulation of cadmium through *Azolla* from aqueous solution. *Ecological Engineering* 37(11):1942-46. Elsevier B.V.: doi:10.1016/j.ecoleng.2011.01.010.
- Thayaparan, M., S. Iqbal, P. Chaturanga y M. C. M. Iqbal. 2013. Rhizofiltration of Pb by *Azolla pinnata*. *International Journal Of Environmental Sciences* 3(6):1811-21. doi:10.6088/ijes.2013030600002.
- Tung, H. F. y T. C. Shen. 1985. Studies of the *Azolla pinnata-Anabaena azollae* Symbiosis: current growth of *Azolla* with rice. *Aquatic Botany* 22:145-52.
- USEPA. 2002. Supplemental guidance for developing soil screening. U.S. Environmental Protection Agency.
- Wan, Yanan, Yao Yu, Qi Wang, Yuhui Qiao y Huafen Li. 2016. Cadmium uptake dynamics and translocation in rice seedling: influence of different forms of selenium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 133:127-34. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.07.001.
- Wilkins, B. D. 1978. The measurement of tolerance to edaphic factors. *New Phytol.* 80:623-33. doi:10.1111/j.1469-8137.1978.tb01595.x.
- Wu, Fei long, Dai yan Lin, and De chun Su. 2011. "The Effect of Planting Oilseed Rape and Compost Application on Heavy Metal Forms in Soil and Cd and Pb Uptake in Rice." *Agricultural Sciences in China* 10 (2). Chinese Academy of Agricultural Sciences: 267-74. doi:10.1016/S1671-2927(11)60004-7.
- Zambrano, J. 1974. Las malezas acuáticas. *Revista de La Facultad de Agronomía* 2(4):87-94.
- Zhang, Feng, Xin Wang, Daixia Yin, Bo Peng, Changyin Tan, Yunguo Liu, Xiaofei Tan, and Shixue Wu. 2015. Efficiency and mechanisms of Cd removal from aqueous solution by biochar derived from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Journal of Environmental Management* 153. Elsevier Ltd: 68-73. doi:10.1016/j.jenvman.2015.01.043.
- Zhao, Xiu lan y Masaihiko Saigusa. 2007. Fractionation and solubility of cadmium in paddy soils amended with porous hydrated calcium silicate. *Journal of Environmental Sciences* 19(3):343-47. doi:10.1016/S1001-0742(07)60056-4.