

FISIOLOGÍA DEL HELECHO ACUÁTICO *Salvinia minima* AL SER EXPUESTO A METALES COMO Pb, Ni, Cu, Zn y Li †

[PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF THE AQUATIC FERN *Salvinia minima* UNDER EXPOSURE TO METALS SUCH Pb, Ni, Cu, Zn AND Li]

Gabriela Fuentes², Daniel Leal-Alvarado¹, Ignacio Fuentes-Franco¹, Tony Hoffmann, Claudia Kutter, David Uh-Ramos, Katiana Trejo, Neyi Estrella, Gerardo Carrillo-Niquete¹, Eduardo Gómez-Hernández¹, and Jorge M. Santamaría^{1*}

¹Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Calle 43,130 x 32 y 34. Chuburná de Hidalgo. 97205. Mérida, Yucatán, México. Email:

jorgesm@cicy.mx

²Independent Researcher. Calle 6a 279a, Jardines de Vista Alegre, 97130. Mérida, Yucatán, México.

*Corresponding author

SUMMARY

Background: Metals can be found in nature, but they are also generated by anthropogenic activities associated with technological waste, such as batteries and electronic components. These metals, when released to the environment may contaminate and cause significant health damage. Phytoremediation is a process to de-contaminate water bodies from metals using plants. Obviously, those plants should be able not only to uptake high amounts of metals, but also, they should be able to tolerate those high concentrations in their tissues. *Salvinia minima* is a fast-growing, floating aquatic fern and its ability to take up metals from the environment has been evaluated. **Objective:** To characterize the physiological and molecular response of *Salvinia minima* plants exposed to different metals. **Methodology:** A system was designed to expose *Salvinia minima* plants to different metals such as Pb, Ni, Cu, Zn and Li, for seven days at different concentrations levels and take samples every 24 h. Various parameters were evaluated including metal uptake, metal concentration in the medium, leaf appearance, PSII efficiency (Fv/Fm), photosynthesis, transpiration, stomatal conductance. **Results:** *S. minima* plants were capable to accumulate Pb (28 mg/g DW at 40 uM), Zn (10 mg/g at 80uM) Li (10 mg/g at 20mM), Cu (8 mg/g at 40 uM) and Ni (4 mg/g at 40 uM), at their roots. At short times (0-24 h) and at low concentrations (of certain metals) no significant physiological damage was observed, however, at high concentrations or longer exposure times (48-144 h), physiological damage can be observed in terms of decreased photosynthesis and PSII efficiency, transpiration and stomatal conductance. **Implications:** *Salvinia minima* plant are capable to take Pb, Ni, Cu, Zn and Li from the medium, which indicates that it is a good candidate to be used in the phytoremediation of water bodies contaminated with these metals. **Conclusions:** *Salvinia minima* plants take up and accumulate high concentrations of Pb, Ni, Cu, Zn and Li in their tissues, thus reducing the metal content of aqueous media. Even though at high concentrations those metals may affect its physiological performance, this occurs at much higher concentrations than those normally found in natural water bodies, therefore *S. minima* is certainly a good candidate to be used for the phytoremediation of water bodies contaminated with metals. **Key words:** Metal contamination; physiology; lithium; nickel; lead; copper; Zinc; abiotic stress.

RESUMEN

Antecedentes: Los metales están presentes en naturaleza y pueden ser utilizados en diversas actividades antropogénicas generando desechos tecnológicos como en baterías y componentes electrónicos. Estos metales al llegar a los mantos freáticos contaminan el agua y producen daños importantes en la salud. La fitorremediación es un proceso que puede ayudar a descontaminar cuerpos de agua contaminados con metales usando plantas. Obviamente las plantas a usar deben ser capaces de tomar grandes cantidades de metales de medios acuosos, pero también ser capaces de acumular y tolerar dichas concentraciones del metal en sus tejidos. *Salvinia minima* es un helecho acuático flotante de rápido crecimiento y se ha evaluado su capacidad de toma

† Submitted December 14, 2023 – Accepted November 15, 2024. <http://doi.org/10.56369/tsaes.5346>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

de metales del medio. **Objetivo:** Caracterizar la respuesta fisiológica y molecular de plantas de *Salvinia minima* expuestas a diferentes metales. **Metodología:** Se diseñó un sistema para exponer plantas de *Salvinia minima* a diferentes metales como plomo (Pb), níquel (Ni), cobre (Cu), zinc (Zn) y litio (Li) durante siete días a diferentes concentraciones y cada 24 h fueron tomadas muestras y parámetros como: toma de metal, metal en el medio, aspecto de hojas, eficiencia del PSII (Fv/Fm), fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática. **Resultados:** Se determinó que las plantas de *S. minima* son capaces de acumular Pb (28 mg /g de peso seco a 40 uM de Pb), Zn (10 mg/g a 80uM) Li (10 mg /g a 20mM), Cu (8 mg/g) y Ni (4 mg/g) en sus raíces. A tiempos cortos (0-24 h) y a bajas concentraciones (de ciertos metales) no se observa daño significativo fisiológico, sin embargo, a altas concentraciones o tiempos de exposición más prolongados (48-144 h), si se observa daño en la fisiología de las plantas expuestas, donde disminuye la fotosíntesis y eficiencia del PSII. Las transpiración y conductancia estomática también disminuye. **Implicaciones:** *Salvinia minima* al ser capaz de tomar Pb, Ni, Cu, Zn y Li del medio y tolerarlo en sus tejidos, representa un excelente candidato para fito-remediar cuerpos de agua contaminados con estos metales. **Conclusiones:** Las plantas de *Salvinia minima* toman y almacenan Pb, Ni, Cu, Zn y Li en sus tejidos. A bajas concentraciones, la fisiología de las plantas parece afectarse poco. A pesar de que a concentraciones más altas de la concentración umbral, las plantas pueden disminuir su eficiencia fisiológica, esto ocurre a concentraciones mucho más altas de las comúnmente encontradas en cuerpos de agua contaminados, de manera que *Salvinia minima* se sugiere como un candidato eficaz en la descontaminación de cuerpos de agua contaminados con estos metales.

Palabras clave: Contaminación por metales; fisiología; litio; níquel; plomo; cobre; Zinc.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de metales pesados en los suelos y los cuerpos de agua se ha convertido en un problema creciente, con cada vez más volúmenes de contaminación de material y equipos electrónicos y pilas, que liberan metales como Pb, Li, Ni, Cu y Zn. Todo ella aumentando la huella ecológica y dañando la flora y la fauna. Así como aumenta la contaminación de mantos freáticos, el aire y el suelo. Con un grave riesgo para la salud humana también.

Estudios han reportado diferentes estrategias para disminuir la toxicidad de los metales pesados, en el ambiente y en especial nuestro interés es disminuir la contaminación de estos metales en los cuerpos de agua. La alternativa es hacer uso de material vegetal, como una herramienta de depuración de suelos y aguas contaminadas. Esta tecnología, llamada fitorremediación, se basa en la capacidad de algunas plantas de acumular grandes cantidades de metales tóxicos. *S. minima* es un helecho acuático flotante con amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales. Esta alternativa permite remediar cuerpos de agua contaminados con metales pesados, mediante el uso de plantas, las cuales puedan acumular grandes cantidades de metales en sus tejidos sin que esto les cause daño fisiológico (hiperacumuladoras). Estas especies vegetales tienen el potencial de fito-remediar de metales pesados los cuerpos de agua, por ejemplo. Las plantas hiperacumuladoras muestran altas tasas de toma de metales, tienen una alta tolerancia al metal y transporta los metales desde las raíces hasta los brotes (Hall, 2002; Suñe *et al.*, 2007).

Se han realizado diferentes evaluaciones en plantas con el fin de conocer su capacidad de absorción. Y determinar si son o no hiperacumuladoras; centrando su interés en su capacidad para acumular metales pesados, sin embargo, es importante que también se evalúen los efectos de estos metales en la fisiología, crecimiento y respuestas tanto bioquímicas y moleculares, que las plantas puedan presentar, al acumular ciertos metales en sus tejidos.

Plomo (Pb)

El plomo es un elemento tóxico que se encuentra presente en el medio ambiente. Este metal es liberado a la biosfera por actividades geológicas y antropogénicas. El plomo es uno de los metales pesados más comunes en la Tierra. El uso de pinturas que contienen plomo, pesticidas antiguos (arseniato de plomo), procesamiento de metales y gasolina que contiene plomo han sido las principales fuentes antropogénicas de plomo. Las operaciones mineras y fundiciones en el norte de México han provocado la contaminación de las aguas con plomo y, por tanto, es un peligro potencial para los seres humanos y el medio ambiente (Hoffmann *et al.*, 2004).

Los efectos de la exposición al Pb en los procesos fisiológicos sugieren una inhibición de la fotosíntesis resultado de la acumulación de plomo por efectos indirectos como: ultra-estructura del cloroplasto distorsionada, inhibición de la síntesis de clorofila, inhibición de la síntesis de plastoquinonas y carotenoides, inhibición del sistema de transporte de electrones, baja concentración de dióxido de carbono a través del

cierre estomático, absorción deficiente de elementos esenciales, como Mn y Fe, y sustitución por Pb. De igual forma las plantas expuestas a Pb afecta su fisiología debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS se producen en el cloroplasto durante el metabolismo celular normal, ya sea como subproductos de la reducción del oxígeno molecular (O_2) o como resultado de la excitación en presencia de pigmentos altamente energizados (Pourrut *et al.*, 2011). El Pb provoca cambios en la composición lipídica de las membranas celulares y pueden inducir la peroxidación lipídica, daño a la membrana y aumento de la fuga de electrolitos (Leal *et al.*, 2016).

Níquel (Ni)

De los muchos metales pesados conocidos en la naturaleza, el Ni es esencial como oligoelemento para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, porque forma parte de algunas enzimas importantes como la ureasa. Sin embargo, en niveles tóxicos, parece afectar una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos en las plantas. Sin embargo, una alta concentración de Ni en el medio de crecimiento puede provocar síntomas de toxicidad y un crecimiento reducido de las plantas (Seregin y Kozhevnikova, 2006). La toxicidad puede resultar de la unión del metal a grupos sulfhidrilo involucrados en la acción catalítica o la integridad estructural de las enzimas. Los efectos tóxicos de las altas concentraciones de Ni en el medio de crecimiento en las plantas incluyen alteración en la absorción de nutrientes esenciales, clorosis, reducción de la absorción de CO_2 , alteraciones en el intercambio de gases, alteraciones en la absorción de agua y generación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno que producen estrés oxidativo (Seregin y Kozhevnikova, 2006; Ma *et al.*, 2009). El níquel también puede reemplazar al Zn o Fe, y otros iones metálicos, en algunas otras metaloenzimas de plantas inferiores (Mulrooney y Hausinger, 2003; Fuentes *et al.*, 2014).

Cobre y Zinc (Cu y Zn)

El cobre (Cu) y el zinc (Zn) tienen una gran demanda en la industria. Sin embargo, estos iones, en altas concentraciones, pueden causar graves daños tanto a la fauna como a la flora. Las actividades humanas (como la minería, los hogares y la aplicación de agroquímicos) han contribuido significativamente al aumento de las concentraciones de cobre y zinc en los cursos de

agua naturales (Azevedo y Peixoto 2015). Esto también se ha visto reforzado por la expansión urbana, el rápido aumento demográfico y la creciente demanda de productos y servicios. En 2020, se estimó que la producción mundial de cobre (Cu) y zinc (Zn) fue de 20.400 y 12.000 millones de toneladas, respectivamente (USGS, 2021a, b). El Cu y el Zn tienen funciones biológicas y las células los necesitan para establecer enlaces estables y de alta afinidad con moléculas orgánicas (Krämer y Clemens 2005) y actuar como cofactores enzimáticos para numerosos procesos biológicos. En las células vegetales, la mayor cantidad de Cu se ha encontrado asociado a los cloroplastos (asociados con la plastocianina) (Tapken *et al.* 2012) y se ha estimado que entre el 12 y el 50 % del Zn celular está involucrado en enzimas que regulan la transcripción y la traducción. procesos (Krämer y Clemens 2005; Carrillo *et al.*, 2022).

Litio (Li)

Haciendo énfasis en la contaminación por litio (Li), ésta va en aumento, debido a que se utiliza en la fabricación de baterías para artículos electrónicos y recientemente autos eléctricos. La problemática es que al terminar su vida útil estas son desechadas ya que su reciclaje excede los beneficios que pudiera generar, pues el costo de litio reciclado es hasta cinco veces el precio del litio producido a partir del proceso menos costoso basado en salmueras. Una vez producidas, las baterías de litio, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años. El Li es un ion altamente tóxico y, se han informado y aún y cuando se recomienda en ciertos tratamientos, se han detectado diversos casos de intoxicación en pacientes tratados con Li (que se usa para el tratamiento profiláctico de los trastornos bipolares). Un aumento en los niveles séricos de litio: 1,5 a 2,5 mmol/L causan una intoxicación moderada; 2,5 a 3,5 mmol/L, una intoxicación severa y más de 3,5 mmol/L amenaza contra la vida (Domínguez *et al.*, 2006). Por lo que, la contaminación por Li en los mantos acuíferos o en los ríos, puede llegar a las comunidades provocando problemas de toxicidad y salud ambiental (Gómez-Hernández, 2023).

Salvinia minima es un helecho acuático flotante, de rápido crecimiento y de fácil manejo, y fácil de remover del cuerpo de agua donde se encuentre. De esta forma, se pueden restaurar sitios contaminados con metales (Hoffmann 2004; Estrella *et al.*, 2009; Leal 2016; Carrillo *et al.*, 2022). *Salvinia minima* elimina el 90% de Pb en 24 horas de exposición (Uh, 2008; Estrella, 2008; Trejo, 2012; Leal *et al.*, 2016), además es capaz de remover otros metales

pesados como Zn, Ni, Cu, Zn y Li (Hoffman 2004; Fuentes *et al.*, 2014; Carrillo *et al.*, 2022; Gómez-Hernández, 2023). Sin embargo, se desconoce cuál es la variación en la toma de estos metales y cual son sus efectos fisiológicos a tiempos cortos de análisis y a diferentes concentraciones (Tabla 1).

Por lo que el objetivo del estudio fue conocer la capacidad de respuestas de *S. minima* en aspectos fisiológicos después de la exposición a metales. Un aspecto prioritario es conocer su capacidad de remoción de los metales del medio acuoso y donde lo concentra (hoja y/o raíz). Los parámetros fisiológicos como fotosíntesis y fluorescencia de clorofila del PSII, nos indicaron algunos mecanismos de respuesta en función del metal evaluado. Mientras la fuga de electrolitos, nos indicó cual es el daño a nivel de membrana que puede generar estos metales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El sitio de colecta de material el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) (20° 967' N, 89° 617' W). Una vez recolectadas las plantas de *Salvinia minima*, fueron lavadas con agua destilada para evitar contaminación. Posteriormente, fueron cultivadas en una solución nutritiva de medio Hoagland (1950) (modificada), al 50% de su fuerza iónica, con un pH de 5.5 y se crecieron en un cuarto con luz artificial con una intensidad de 100 μmol fotones de luz $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a una temperatura controlada de 25 ± 2 °C, con humedad relativa de $70 \pm 5\%$, y con fotoperiodo 12/12 horas (luz/oscuridad).

Tratamiento de exposición a metales

Con el objetivo de evaluar la capacidad de *Salvinia minima* para tomar Pb, Ni, Cu, Zn y Li en muestra acuosa, se establecieron unidades experimentales usando cajas magentas de 400 mL de capacidad. El volumen acuoso usado fue de 50 mL por cada magenta y se adicionó 20 unidades de biomasa vegetal (cada unidad corresponde a un par de hojas y un par de raíces). Se realizó un experimento exposición de cada uno de los metales con las siguientes concentraciones: Pb (0, 20 y 40 μM), Ni (0 y 40 μM), Cu (0, 20, 40, 80 μM), Zn (0, 20, 40, 80 μM) y Li (0, 0.1, 1, 10, 20 mM) y se evaluaron diferentes tiempos de exposición. Para cada concentración se evaluaron 3 unidades experimentales (cada unidad con 10 plantas). Las plantas se cultivaron a una temperatura de 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 12/12 (luz/oscuridad).

Evaluación de la concentración endógena de metales

Para cada metal se evaluó el contenido de metal en el tejido de la planta (tanto en hoja como en raíz y la suma de ambos, se tomó como el total del metal en la planta) y en el medio, a lo largo de la cinética de concentración y tiempo en cada experimento-respuesta-metal. La cuantificación del metal se llevó a cabo en un espectrofotómetro de emisión óptica inductivamente acoplado a plasma (ICP-OES 400 Perkin-Elmer, USA) usando estándares (Sigma Chem., St. Louis, MO, USA) para cada curva de calibración y las lecturas se tomaron a diferentes longitudes de onda, dependiendo del metal (Hoffmann *et al.*, 2004). De igual forma, se tomaron fotografías para conocer el estado de las hojas expuesta a cada metal en condiciones de concentración y tiempo-dependientes.

Evaluación de variables fisiológicas

Se realizó un registro fotográfico de las plantas de *S. minima* durante la cinética de crecimiento, para observar los posibles daños causados por la exposición al metal. Se evaluó la toma del metal como contenido del mismo en los tejidos de raíz y hoja (por separado), según el protocolo establecido por Cabañas (2020). Se evaluaron los parámetros fisiológicos como: fotosíntesis (P_n , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), fluorescencia de clorofila del PSII (evaluando F_v/F_m) y fuga de electrolitos (en raíz y hojas en %), de acuerdo a los protocolos de Fuentes *et al.* (2014) con modificaciones. Para la P_n se usó un analizador de gases en el espectro infrarrojo portátil (IRGA) marca Li-COR modelo LI6400 (LiCor Inc., Lincoln, Nebraska; EEUU). La eficiencia fotosintética se evaluó mediante el cociente F_v/F_m , mediante un fluorómetro de clorofila tipo Multi-PEA (MPEA) (FMS 2 Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK). La fuga de electrolitos se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Fuentes (2014), con modificaciones. La expresión de genes se realizó mediante la metodología de RT-PCR, establecida por Leal (2017), con modificaciones.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Para cada concentración se evaluaron 3 unidades experimentales (cada unidad con 10 plantas). En cada caso se incluyó un control (plantas sin exposición al metal) y un grupo al que se expuso a cada uno de los diferentes metales en diferentes concentraciones por diferentes tiempos de exposición. Los datos fueron analizados mediante una prueba T-Student ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Respuesta a Pb

Contenido. Las plantas de *S. minima* son capaces de tomar Pb del medio líquido de una forma eficiente, las plantas expuestas a 20 uM pueden acumular 10.62 mg Pb/g de peso seco y a 40 uM de Pb se observa un contenido de 22 mg Pb/g de peso seco en plantas expuestas al metal. La toma de Pb lo llevan a cabo en una forma bifásica con una toma inicial muy rápida a las 6 de exposición al Pb, después de 24 h se observa una toma del 94% del Pb en el medio. Se observó un mayor contenido en raíces que en hojas (Figura 1). **Apariencia.** A partir del día 15 a 20 uM de Pb, se observan hojas cloróticas mientras a concentraciones de 40 uM de Pb a los 15 días, se observa una fenolización de las hojas, que va de adentro hacia afuera de las mismas. **Fotosíntesis y fluorescencia.** La fotosíntesis disminuyó a partir de las 3 h de exposición a Pb bajando de 2 a 1.5 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, pero a las 24 de exposición los valores bajan a 1 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y a las 48 h los valores de fotosíntesis llegan a ser cercanos al punto de compensación (Figura 2). La fluorescencia de clorofila se ve afectada, pero en menor medida que la fotosíntesis (Figura 3). **Fuga de electrolitos.** El daño a membrana determinada como fuga de electrolitos, se observa a partir de las 6 h, cuando las plantas son expuestas a 40 uM de Pb. A las 24

h el daño corresponde al 50% del total y después de 48 h de exposición al metal, se produce el mayor daño (Figura 4).

Respuesta a Ni

Contenido. Se observó que las plantas control (hojas y raíces), no presentaron Ni en sus tejidos, mientras que al ser expuesta a 40 uM de Ni, las plantas de *S. minima*, tuvieron un comportamiento diferencial entre hojas y raíces, sin embargo la toma fue incrementando según el tiempo de exposición. Las hojas toman Ni en forma más lenta mientras en raíces la toma es mayor y más rápida (Figura 1). **Apariencia.** A partir de las 3 h se observó Ni en hojas y raíces hasta las 144 de exposición. Al realizar evaluaciones histológicas, se observó diferencias entre las plantas control y las expuestas a Ni, se observa un xilema y cámaras de aire más grandes en plantas control que aquellas expuestas a 144 h de Ni. **Fotosíntesis y fluorescencia.** La fotosíntesis se ve afectada a tiempos cortos de exposición a Ni de 24-48 h y se acentúa a tiempos largo de 144 h de exposición a Ni (Figura 2), al igual que la fluorescencia de clorofila medida Fv/Fm (Figura 3). **Fuga de electrolitos.** La estabilidad de la membrana medida como fuga de electrolitos se ve afectada a tiempos de 144 h de exposición a Ni, tanto en hojas como en raíces (Figura 4).

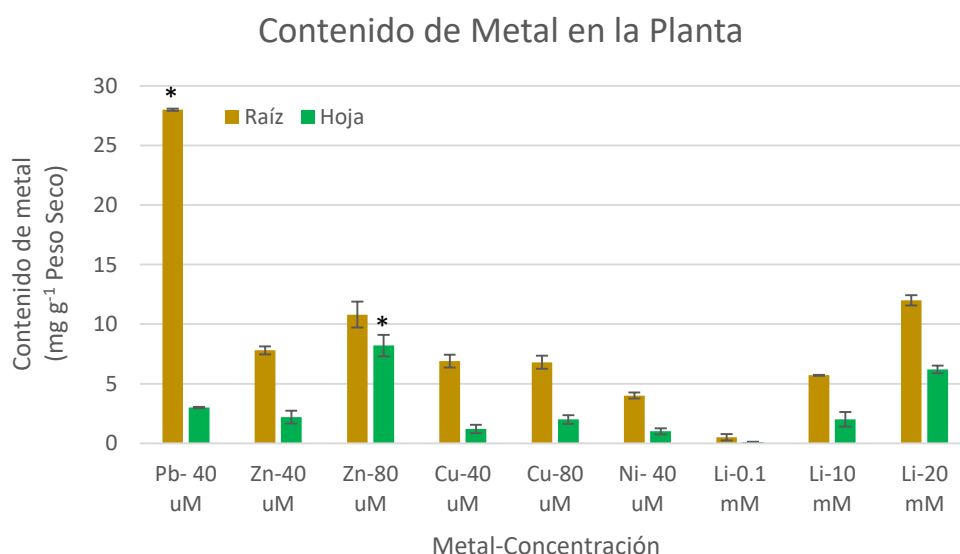


Figura 1. Contenido de metal (mg g^{-1} peso seco) endógeno en raíz y hojas de plantas de *Salvinia minima* en respuesta a exposición a metales como: Pb, Zn, Cu, Ni y Li, en diferentes concentraciones indicadas, después de 48 h de exposición al metal según corresponda. Las barras corresponden a la media \pm la desviación estándar. El asterisco designa diferencias significativas ($p < 0.05$).

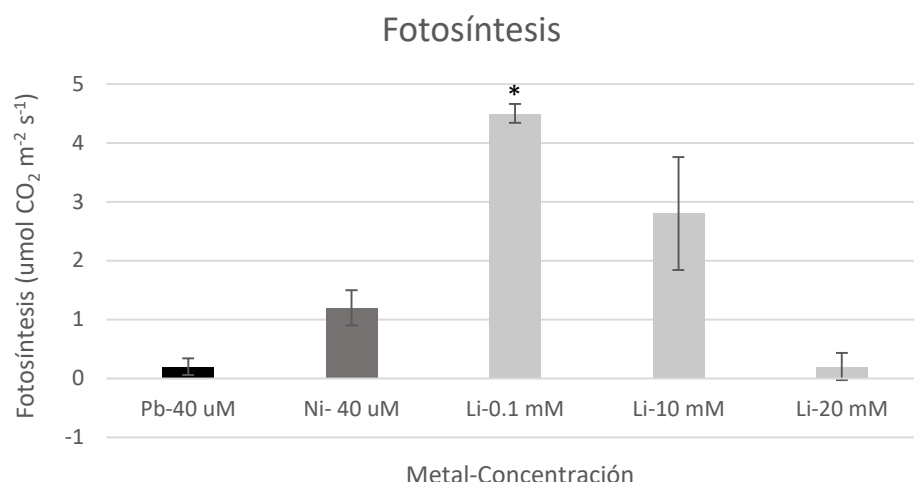


Figura 2. Fotosíntesis (umol CO₂ m⁻² s⁻¹) de plantas de *Salvinia minima* en respuesta a exposición a metales como: Pb, Ni y Li, en diferentes concentraciones indicadas, después de 48 h de exposición al metal según corresponda. Las barras corresponden a la media \pm la desviación estandar. El asterisco designa diferencias significativas ($p < 0.05$).

Respuesta a Cu

Contenido. La toma de Cu por parte de la planta fue concentración dependiente donde las raíces tienen mayor contenido de Cu que las hojas. Y el mayor contenido se observó en las primeras 24 h en ambos tejidos (Figura 1). **Apariencia.** Las plantas expuestas a 80 uM de Cu, mostraron un color café oscuro, en varias de las hojas más antiguas después de 4 días de exposición. **Fluorescencia.** La fluorescencia de clorofila como Fv/Fm se vio afectada por Cu en una forma concentración-

dependiente, donde Cu a 20 uM tuvo un ligero decremento en Fv/Fm mientras que Cu a 80 uM presentó un valor de Fv/Fm de 0.63 (Figura 3).

Fuga de electrolitos. No se observó un aparente daño en membrana en respuesta a 20 y 40 uM de Cu mientras a 80 uM se observó un ligero daño en el día dos de exposición a Zn, en hojas; mientras se observó un daño incrementado en la membrana de raíces, donde la fuga de electrolitos aumento en un rango de 40 y 75%, para la exposición a 20 y 80 uM de Cu, respetivamente (Figura 4).

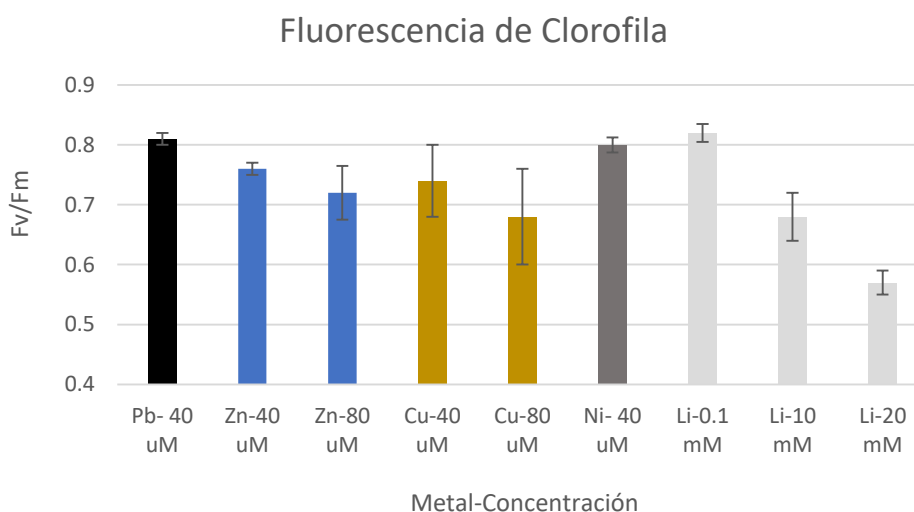


Figura 3. Fluorescencia de clorofila PSII (Fv/Fm) en plantas de *Salvinia minima* en respuesta a exposición a metales como: Pb, Zn, Cu, Ni, Li, en diferentes concentraciones indicadas, después de 48 h de exposición al metal según corresponda. Las barras corresponden a la media \pm la desviación estandar. El asterisco designa diferencias significativas ($p < 0.05$).

Respuesta a Zn

Contenido. La toma de Zn por parte de la planta fue concentración dependiente donde las raíces tienen mayor contenido que las hojas (Figura 1). Adicionalmente, el mayor contenido se observó en las primeras 24 h en ambos tejidos. **Apariencia.** Las plantas expuestas a 80 μM de Zn, mostraron un color café-claro muy tenue, en algunas hojas de las mas antiguas, después de 4 días de exposición. **Fluorescencia.** La fluorescencia de clorofila como Fv/Fm se vió afectada por Zn en una forma concentración-dependiente, donde Zn a 20 μM no tuvo efecto negativo mientras que Zn a 80 μM presentó un valor de Fv/Fm de 0.7 (Figura 3). **Fuga de electrolitos.** No se observó un aparente daño en membrana en respuesta a 20 y 40 μM de Zn, mientras que a 80 μM se observó un ligero daño en el día dos de exposición a Zn, tanto en hojas como en raíces, determinado como fuga de electrolitos (Figura 4).

Respuesta a Li

Contenido. Se observó que las plantas control no presentaron Li en sus tejidos mientras si se observó Li en aquellas plantas expuestas a 0.1, 1, 10, 20 mM. El contenido de Li en las plantas de *S. minima* fue concentración-dependiente y estuvo relacionado con el tiempo de exposición. A concentraciones de 0.1 y 1 mM de Li el contenido de Li fue bajo en relación a aquellas plantas expuestas a 10 y 20 mM donde se observaron las mayores concentraciones de Li. Un contenido alto de Li en la planta, se observó después de 6 h de exposición (a altas concentraciones) que incremento hasta las 96 h de exposición al metal. Por otro lado, se observa que la concentración del Li en el medio va disminuyendo conforme pasa el tiempo y a bajas concentraciones (0.1 y 1 mM), la concentración llega a ser cercana a 0 (Figura 1). **Apariencia.** Las plantas de *S. minima* expuestas a a 20 mM muestran un color de hojas verde claro y una clorosis, después de 24-48 h de exposición,

comparadas con las plantas control. **Fotosíntesis y Fluorescencia.** A concentraciones de 10 y 20 mM de Li después de 24 h de exposición, se observó una disminución en la fotosíntesis de las plantas, la cual fue más afectada después de 96 h de exposición a 20 mM de Li (Figura 2). La fluorescencia de clorofila se afectó a concentraciones de 10 y 20 mM donde los valores control (0.8) cayeron a 0.75 y 0.57, respectivamente, después de 96 h de exposición (Figura 3). **Fuga de electrolitos.** El porcentaje de daño en membrana se observó mayor en raíces que en hojas. La concentración más de 20 mM generó los mayores daños mientras las concentraciones de 0.1 y 1 mM de Li indujo menores daños, a lo largo de 96 h de exposición (Figura 4). **Expresión de genes.** Los genes transportadores tipo ABCC y ABCG mostraron una expresión diferencial entre tejidos de hojas y raíces; y también diferencial entre las concentraciones de exposición a Li evaluadas. El gene ABCC muestra una menor expresión después de 96 h de exposición a 20 mM de Li en hojas. Mientras el gen ABCG está más expresado en raíces que en hojas, con mayor expresión a las 24-48 h; mientras en raíces se observó la mayor expresión de las 24-96 h de exposición a Li, tanto a 0.1 como a 20 mM.

Nuestros resultados indican que *S. minima* es capaz de remover metales de soluciones del medio y tomarlo en sus tejidos. No solamente Pb, Ni, Cu, Zn y Li, sino también lleva a cabo la remoción de Cd por la especie *S. herzogii* (Maine *et al.*, 2001; Martelo y Lara, 2012). Autores como Olguín *et al.* (2002), evaluaron la capacidad de *Salvinia minima* para remover metales, como: cadmio y plomo de soluciones acuosas, bajo condiciones controladas (pH 7 a 30°C), con capacidad de remoción de 83 % y 97 %, respectivamente. Se ha demostrado que *Salvinia minima* tiene el potencial para remediar cobre (Cu) en concentraciones varias veces más alta que la encontrada en ambientes de agua fresca (Al-Hamdani & Blair, 2004).

*

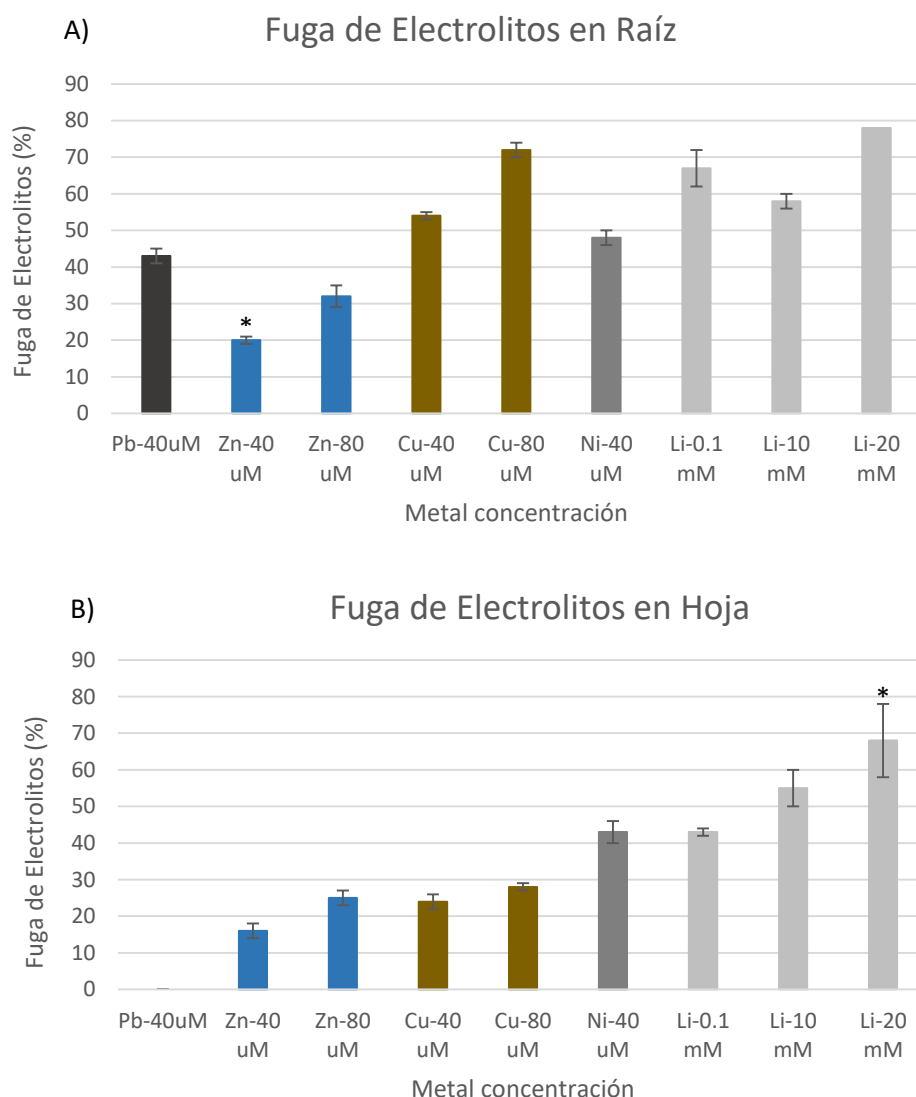


Figura 4. Fuga de electrolitos (%) de plantas de *Salvinia minima* en respuesta a exposición a metales como: Pb, Zn, Cu, Ni y Li y en diferentes concentraciones indicadas, tanto en tejido de raíz A) como en hoja B), después de 48 h de exposición al metal. Las barras corresponden a la media \pm la desviación estandar. El asterísco designa diferencias significativas ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES

Salvinia minima es capaz de tomar y acumular diversos metales en sus tejidos. La toma de metales se hace de forma diferencial entre raíces y hojas. La toma y acumulación depende del metal y así de la concentración a la que se expone. La respuesta fisiológica depende del metal, la concentración y tiempo de exposición. Los mecanismos de respuesta dependen del metal. Nosotros analizamos que la planta al ser expuesta a metales altamente tóxicos y dañinos, los puede acumular como son Pb, Ni y Li, y también acumula otros metales como

Zn y Cu. La respuesta fisiológica indica que cada metal induce un mecanismo particular en la planta. Las concentraciones a las que se han expuesto las plantas de *Salvinia* para Pb van desde 20 uM hasta 160 uM; mientras que para la exposición de Li se han evaluado concentraciones que van de 0.1 mM hasta 20 mM. En forma consistente, los metales evaluados en este estudio: Pb, Ni, Cu, Zn y Li, han sido detectados y se observó su contenido en hojas y en raíces (toma de metales, Figura 1). Sin embargo, se evaluó que el contenido de cada metal es mayor en raíces que en hojas. Se observó que la fotosíntesis se ve más afectada por Pb y Ni que por

Li. Lo cual nos indica el mecanismo en respuesta a exposición a cada metal (Figura 2). Por otro lado, la fluorescencia de clorofila se ve mas afectada por Cu que por Zn, Ni, Pb y Li. La fluorescencia de clorofila (Fv/Fm) es un indicador del estado del transporte de electrones en el fotosistema II (Figura 3). En el caso del daño a membrana, se observó que la exposición a los metales Cu, Li, Ni y Pb, produce más daño que la exposición a Zn en el caso de raíz; mientras que en hojas en mayor el daño en membrana se observó al ser las plantas expuestas a Li y Ni que a Zn y Cu, donde se observó menor porcentaje de fuga de electrolitos (Figura 4). Por lo cual se concluye que *Salvinia minima* puede remediar metales del agua, en forma diferencial y una vez que el metal se encuentre en el tejido de la planta, esta se puede recolectar y dar algún tratamiento químico (para recuperar el metal y darle un nuevo uso).

Agradecimientos

Se agradece al Jardín Botánico Regional (CICY) “Roger Orellana”, por proporcionar las plantas de *Salvinia*. Se agradece al Dr. Enrique Sauri Duch, del Instituto Tecnológico de Merida, por el equipo ICP-OES 400 Perkin- Elmer USA.

Funding: EGH recibió una beca del Conahcyt para realizar estudios de postgrado.

Conflict of interests. The authors declare that they have no conflicts of interest.

Compliance with ethical standards. Informed consent was obtained from survey participants.

Data availability. Data are available with the corresponding author of this publication upon reasonable request

Author contribution statement (CRediT). **D. Leal-Alvarado**, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Investigation, Editing, Data curation. **I. Fuentes-Franco**, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Investigation, Editing, Data curation. **T. Hoffmann**, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Investigation, Editing, Data curation. **C. Kutter**, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Investigation, Editing, Data curation. **D. Uh-Ramos**, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Investigation, Editing, Data curation. **K. Trejo**, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Investigation, Editing, Data curation. **N. Estrella**, Formal analysis, Investigation, Methodology,

Validation, Investigation, Editing, Data curation. **G. Carrillo-Niquete**, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Investigation, Editing, Data curation. **E. Gómez-Hernández**, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Investigation, Editing, Data curation. **G. Fuentes**, Supervision, Writing-original draft, Writing-review, Visualization, Editing, Data curation. **J.M. Santamaría**, Conceptualization, Project administration, Resources, Formal Analysis, Writing-review, Data curation.

REFERENCES

- Al-Hamdani, SH and Blair, S.L., 2004. Influence of copper on selected physiological responses in *Salvinia minima* and its potential use in copper remediation. *American Fern Journal*, 94, pp. 47-56.
- Cabañas-Mendoza, M., Santamaría, J.M., Sauri-Duch, E., Escobedo-Gracia, R.M. and Andrade, J.L., 2020. Salinity affects pH and lead availability in two mangrove plant species. *Environmental Research Communications*, 2 (6), pp. 061004. <https://doi.org/10.1088/2515-7620/ab9992>.
- Carrillo-Niquete, A., Andrade, J.L., Hernández-Terrones, L., Cobos-Gasca, V., Fuentes, G. and Santamaría, JM., 2022. Copper accumulation in the aquatic fern *Salvinia minima* causes more severe physiological stress than zinc. *BioMetals*, 35(5), pp. 1043-1057. <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00423-3>
- De Azevedo, J.P.A. and Peixoto, H.M.N., 2015. Biomass reduction of *Salvinia molesta* exposed to copper sulfate pentahydrate (CuSO₄ 5H₂O). *Revista Ambiente & Agua*, 10, pp. 520–529. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1633>
- Domínguez, O.L., Medina, O.O. and Cabrera, García-Armenter, S., 2006. Intoxicación con litio. *Anales de Medicina Interna*, 23, pp. 441-445. <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0212-71992006000900010&lng=es&tlng=es>
- Estrella, G.N., Mendoza, C.D., Moreno, S.R., Gonzalez, M.D., Zapata, P.O., Hernández,

- A.M. and Santamaría J.M., 2009. The pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb²⁺ by increasing phytochelatin synthesis via changes in SmPCs expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquatic Toxicology*, 91, pp.320-328.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.11.002>
- Estrella, G.N.E., 2008. Estudio del efecto de la acumulación de Pb²⁺ sobre la biosíntesis de fitoquelatinas y de glutatión en el helecho acuático *Salvinia minima* Baker. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias y Biotecnológicas de Plantas. CICY. Mérida. Yucatán México.
- Fuentes, I., Espadas, F., Talavera, C., Fuentes, G. and Santamaria, J.M., 2014. Capacity of the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker) to accumulate high concentrations of nickel in its tissues, and its effect on plant physiological processes. *Aquatic Toxicology*, 155, pp. 142-150.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.016>
- Fuentes, I.I., Espadas, G.F., Talavera, M.C., Fuentes, G. and Santamaria, J.M., 2014. Capacity of the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker) to accumulate high concentrations of nickel in its tissues, and its effect on plant physiological processes. *Aquatic Toxicology*, 155, pp. 142-150.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.016>
- Gómez-Hernández, E., 2023. Expresión de genes transportadores y caracterización fisiológica de *Salvinia minima* en respuesta a litio. Mestría en Ciencias. Posgrado en Ciencias Biológicas de Plantas, CICY, Mérida, Yucatán, México, 110 p.
- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53, pp. 1-11.
- Hoffmann, T., Kutter, C. and Santamaría, J.M., 2004. Capacity of *Salvinia minima* Baker to tolerate and accumulate As and Pb. *Acta Biotechnologica*, 4(1), pp. 61-65.
<https://doi.org/10.1002/elsc.200400008>
- Krämer, U. and Clemens, S., 2005. Functions and homeostasis of zinc, copper and nickel in plants. In: *Molecular Biology of Metals Homeostasis and Detoxification*. Springer. Alemania.
- Leal, D., 2016. Caracterización de la estructura y expresión de genes con función putativa de transportadores, que se expresan en respuesta a estrés por plomo en *Salvinia minima* B. Posgrado en Ciencias Biológicas, CICY, Mérida, Yucatán, México.
- Leal, D., Espadas-Gil, F., Sáenz-Carbonell, L., Talavera-May, C. and Santamaría, J.M., 2016. Lead accumulation reduces photosynthesis in the lead hyperaccumulator *Salvinia minima* Baker, by affecting cell membrane and inducing stomatal closure. *Aquatic Toxicology*, 171, pp. 37-47.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.12.008>
- Leal, D., Estrella, H., Saenz, L., Ramírez, J.H., Zapata, O. and Santamaria, J.M., 2018. Genes coding for transporters showed a rapid and sharp increase in their expression in response to lead, in the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, pp. 1056-1064.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.046>
- Ma, Y., Rajkumar, M. and Freitas H., 2009. Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant plant growth promoting bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 166, pp. 1154-1161.
- Maine, M.A., Duarte, M.V. and Suñé, N. L., 2001. Cadmium uptake by floating macrophytes. *Water research*, 35, pp. 2629-2634.
- Martelo, J. and Lara, B.J.A., 2012. Floating macrophytes on the wastewater treatment: a state of the art review. *Ingeniería y Ciencia*, 8, pp. 221-143.
- Mulrooney, S.B. and Hausinger, R.P., 2003. Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 27, pp. 239-261.

- Olguin, J., Hernandez and Ramos E.I., 2002. The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. *Acta Biotechnology*, 22, pp. 121-131.
- Pourrut B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. and Pinelli, E., 2011. Lead uptake, toxicity and detoxification in plants, In: Whitacre, D.N., *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 213, Springer, New York. Pp.113-136.
- Seregin, I. and Kozhevnikova, A.D., 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53, p. 257-277.
- Suñe, N., Maine, M.A., Sánchez G. and Caffaratti, S., 2007. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environmental Pollution*, 145, pp. 467-473.
- Tapken, W., Ravet, K. and Pilon, M., 2012. Plastocyanin controls the stabilization of the thylakoid Cu-transporting P-type ATPase PAA2/HMA8 in response to low copper in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, pp. 18544-18550.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318204>
- Trejo, G.K., 2012. Caracterización de la expresión diferencial de 6 genes en respuesta al plomo en *Salvinia minima* Baker. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. CICY. Mérida Yucatán México.
- Uh, J.D., 2008. Identificación y aislamiento de genes expresados diferencialmente en *Salvinia minima* en respuesta a Pb. Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, CICY, Mérida, Yucatán, México, 145 p.
- USGS., 2021a. Commodity summaries: copper, vol 73. U.S. Department of the Interior Geological Survey, Reston, pp 2020–2021.
- USGS., 2021b. Commodity summaries: zinc, vol 703. U.S. Department of the Interior Geological Survey, Reston, pp 2020–2021.