

## DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS DEL MERCURIO EN LA ESPECIE *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf

### DETERMINATION OF THE TOXIC EFFECTS OF MERCURY IN THE *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf SPECIES

Gladis E. Morales<sup>1</sup>, Jorge L. Gallego<sup>1</sup>

(1) Universidad de Medellín, Facultad de Ingenierías, Carrera 87 # 30-65, Medellín - Colombia  
(e-mail: gmorales@udem.edu.com)

Recibido: 09/12/2011 - Evaluado: 30/01/2012 - Aceptado: 09/05/2012

#### RESUMEN

En este trabajo se ha evaluado, a escala de laboratorio, el efecto tóxico del mercurio en el desarrollo radicular y aumento de biomasa de la especie *Brachiaria dictyoneura* con el fin de obtener un intervalo de concentración adecuado para el estudio de la acumulación de Hg (II). Se sometieron semillas de *Brachiaria dictyoneura* a diferentes niveles de mercurio, se determinó la cinética de germinación y luego de un periodo de crecimiento de 20 días se determinó la longitud de las raíces y la biomasa. Se encontraron efectos nocivos en el desarrollo radicular respecto al control a partir de 25 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup>; para la biomasa seca las diferencias se encuentran a partir de 5 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> y a partir de 75 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> en el tiempo de emergencia de semillas, de ahí que se sugiere trabajar concentraciones que no superen las 25 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato.

#### ABSTRACT

In this research has been evaluated, on a laboratory scale, the toxic effect of mercury on the root development and biomass growth of the *Brachiaria dictyoneura* species, with the goal of finding an adequate concentration interval for the study on the accumulation of Hg (II). *Brachiaria dictyoneura* seeds were exposed to different amounts of mercury, the germination kinetics were determined, and after a 20 day growth period the length of the roots and the biomass were measured. There were found harmful effects on the root development starting at 25 mg\*kg<sup>-1</sup> Hg (II); for the dry biomass the differences were found starting at 5 mg\*kg<sup>-1</sup> Hg (II) and starting at 75 mg\*kg<sup>-1</sup> Hg (II) for the seed emergency time, therefore, working with concentrations not exceeding 25 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> of substrate is suggested.

Palabras clave: fitorremediación; biomasa; fitotoxicidad; *Brachiaria dictyoneura*

Keywords: phytoremediation; biomass; phytotoxicity; *Brachiaria dictyoneura*

## INTRODUCCIÓN

A los metales pesados como el mercurio se les conoce como unos de los mayores tóxicos a nivel industrial y ambiental, en la actualidad la contaminación del suelo generada constituye una problemática grave debido a que éstos aún son liberados al ambiente por diferentes procesos industriales, amenazando el equilibrio de los ecosistemas y la salud humana (Gaona, 2004; Moreno *et al.*, 2005). En Colombia la actividad relacionada con la minería del oro ocasiona impactos ambientales debido al uso no controlado de mercurio, presentándose problemas de contaminación de aire, agua y suelos en diferentes regiones del país (Ramos *et al.*, 2000).

A nivel mundial frente al problema de contaminación por metales pesados, se han explorado diferentes alternativas de tratamiento y aún persiste la necesidad por desarrollar métodos apropiados, eficientes y de bajo costo para la remoción de estos contaminantes (LeDuc & Terry, 2005). Se ha determinado que las plantas tienen diferentes propiedades naturales que las hacen ideales para el tratamiento de suelos en un proceso denominado fitorremediación, en el cual se utilizan las plantas para controlar los contaminantes orgánicos o inorgánicos del suelo (Lomonte *et al.*, 2010). La especie *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf. presenta buen cubrimiento y tolerancia a la presencia de tóxicos, especialmente mercurio; esta planta tiene la capacidad de asimilar y acumular el mercurio, lo que la convierte en un potencial para la remediación de suelos (Giraldo *et al.*, 2006).

Para el desarrollo de sistemas de tratamiento por fitorremediación empleando *Brachiaria dictyoneura* es necesario evaluar y caracterizar los diferentes procesos asociados a la respuesta de la planta frente al contaminante y las transformaciones químicas que éste pueda tener.

En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la fitotoxicidad del mercurio en la especie *Brachiaria dictyoneura* a escala de laboratorio. El resultado que se presenta constituye el primer paso para el estudio de la capacidad de fitorremediación de esta planta y su posterior aplicación en campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones de siembra

Se seleccionaron semillas de *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf certificadas 95% de pureza (Semillas & Semillas Ltda., Colombia) y como medio de crecimiento se empleó arena previamente tamizada entre mallas N° 10 y N° 100, garantizando homogeneidad en el tamaño de partícula. La arena fue lavada y posteriormente el material seco es llevado a estufa 170° C para su desinfección. El sistema de siembra se expuso a fotoperiodo de 12 horas, a una temperatura ambiente promedio de 23°C y se mantuvo la humedad alrededor del 60% de la máxima capacidad de retención de agua (ASTM-E 1963, 2009; ICONTEC-NTC 4508, 1998; ICONTEC-NTC 4509, 1998).

### Prueba de fitotoxicidad del mercurio en *Brachiaria dictyoneura*

Este ensayo permitió evaluar la germinación y la respuesta de *Brachiaria dictyoneura* a diferentes niveles de Hg (II) durante las primeras etapas de crecimiento, el cual fue adicionado una sola vez. Se prepararon germinadores con 2000 g de arena estéril con concentraciones de mercurio de 5, 10, 25, 75 y 300 mg Hg<sup>2+</sup>kg<sup>-1</sup> y control, distribuidos en un diseño completamente al azar. El tiempo de germinación, la longitud de raíces y la biomasa en base seca de los retoños de las plantas de ensayo se compararon con los de las plantas de control.

Se consideraron como criterios de fitotoxicidad la menor concentración con efecto observado (LOEC) y la concentración sin efecto observado (NOEC), que corresponde al nivel inmediatamente inferior al LOEC donde no se manifiestan efectos significativos (ICONTEC-NTC 4508, 1998).

## Ensayo preliminar

Se realizó un ensayo preliminar para validar las condiciones de siembra y encontrar el rango de concentraciones a utilizar en el ensayo definitivo. Se sembraron semillas de *Brachiaria dictyoneura* con diferentes niveles de mercurio. Se utilizó arena estéril como sustrato y el mercurio fue adicionado como  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  en concentraciones de 0, 5, 10, 25, 75 y 300 mg Hg (II)  $\text{kg}^{-1}$  sustrato distribuidos en un diseño completamente al azar con 2 réplicas; se sembraron 80 semillas por cada unidad experimental, pH 6,9 (ICONTEC-NTC 5264, 2008), fotoperiodo de 12 horas (luz natural) y temperatura ambiente. El ensayo fue suspendido 20 días después de alcanzar el 50% de germinación en el control, luego se determinó la longitud de raíz. (ICONTEC-NTC 4508, 1998).

## Determinación de efectos tóxicos

Se analizó el efecto la concentración del mercurio en el crecimiento de *Brachiaria dictyoneura*. Para realizar esta evaluación se consideraron los efectos en el tiempo que tarda la germinación, la pérdida de biomasa en peso seco de la planta, crecimiento de raíces y síntomas de toxicidad como coloración de hojas y crecimiento irregular (Bharagava *et al.*, 2008; do Carmo *et al.*, 2008; Shiyab *et al.*, 2009).

Se utilizó un diseño por bloques completos al azar, el mercurio fue adicionado como  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  en concentraciones de 0, 5, 10, 25, 50 y 75 mg Hg (II)  $\text{kg}^{-1}$  arena con 3 réplicas; como factor de bloqueo con dos niveles, se evaluaron por cada concentración de mercurio 20 semillas sembradas directamente en el sustrato contaminado y 25 trasplantadas luego de haber germinado en medio estéril, según la norma NTC 4508. En ambos casos la siembra se mantuvo con una humedad alrededor del 60% de la máxima capacidad de retención de agua del sustrato. Como respuesta al efecto tóxico se determinaron el tiempo de germinación, la longitud de raíz y la biomasa.

Se determinó el pH inicial ( $5,56 \pm 0,3658$ ) y final del sustrato ( $5,73 \pm 0,4104$ ). De manera cualitativa, se hizo seguimiento cada dos días del avance de la germinación y del crecimiento de las plantas. El experimento se suspendió 20 días después de alcanzar el 50% de la germinación en las muestras control; para la determinación del peso seco, las plantas se sometieron a secado durante 16 h a 40°C (ASTM-E 1963, 2009; ICONTEC-NTC 4508, 1998; ICONTEC-NTC 4509, 1998).

## Análisis estadístico

El programa Statgraphics Plus 4.1 fue usado realizar las comparaciones entre los diferentes niveles de concentración así como entre los diferentes medios de cultivo, aplicando un análisis de varianza; ANOVA en una Vía y Multifactor ANOVA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayo preliminar

Se aplicó el análisis simple de varianza al diseño completamente al azar con los niveles de 0, 5, 10, 25, 75 y 300 mg Hg (II)  $\text{kg}^{-1}$  sustrato para desarrollo radicular, se obtuvo un valor-P de 0.000 indicando diferencias significativas entre los efectos ocasionados por cada nivel de mercurio en el crecimiento de las raíces de *Brachiaria dictyoneura* al día 20 luego de alcanzar el 50% de la germinación en el grupo de control (Tabla 1).

Mediante la prueba de múltiples rangos (Tabla 2, Tabla 3) y Test de Fisher (Figura 1) se encuentra que no hay diferencias significativas entre el control y 5 mg  $\text{Hg}(\text{II}) \cdot \text{kg}^{-1}$  de sustrato, en crecimiento radicular. Se encuentran diferencias significativas respecto al control a partir de 10 mg  $\text{Hg}(\text{II}) \cdot \text{kg}^{-1}$  de sustrato, donde se obtuvo una media menor en la longitud de la raíz, este efecto es más marcado en 25 y 75 mg  $\text{Hg}(\text{II}) \cdot \text{kg}^{-1}$  de sustrato, que conforman un grupo homogéneo. A 300 mg  $\text{Hg}(\text{II}) \cdot \text{kg}^{-1}$  de sustrato, se obtuvo en promedio un crecimiento de 0,14 cm.

Tabla 1: ANOVA. Variaciones en la longitud de la Raíz derivadas de la aplicación diferentes concentraciones de Hg(II), en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> sustrato

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	299,445	5	59,889	95,19	0,0000
Intra grupos	225,874	359	0,629175		
Total (Corr.)	525,319	364			

Tabla 2: Pruebas de Múltiple Rangos. Variaciones en la longitud de la Raíz derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II).

mg Hg(II)*kg <sup>-1</sup> de sustrato	Casos	Media	Grupos Homogéneos
300	36	0,141667	X
75	48	0,366667	X X
25	51	0,584314	X
10	93	2,00215	X
0	77	2,26494	X
5	60	2,50667	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tabla 3: Pruebas de Múltiple Rangos. Variaciones en la longitud de la Raíz derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II).

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 5		-0,241732	0,268621
0 - 10	*	0,262785	0,240347
0 - 25	*	1,68062	0,281628
0 - 75	*	1,89827	0,286873
0 - 300	*	2,12327	0,314952
5 - 10	*	0,504516	0,258303
5 - 25	*	1,92235	0,2971
5 - 75	*	2,14	0,302076
5 - 300	*	2,365	0,328859
10 - 25	*	1,41784	0,271804
10 - 75	*	1,63548	0,277235
10 - 300	*	1,86048	0,306199
25 - 75		0,217647	0,313699
25 - 300	*	0,442647	0,339566
75 - 300		0,225	0,343929

\* indica una diferencia significativa.

Se obtuvo la regresión entre los valores de la media observada en longitud de raíz y los diferentes niveles de mercurio (Figura 2), ajustándose a un modelo recíprocal-Y de la forma  $Y = 1/(a + b \cdot X)$  (ecuación 1). La variable dependiente es la longitud de la raíz expresada en centímetros y la variable independiente la concentración de Hg (II) expresada en mg Hg (II) kg<sup>-1</sup> de sustrato. La ANOVA arrojó un valor P de 0.0002 lo que indica que existe una relación estadísticamente significativa entre la longitud de raíz y la concentración de mercurio en el sustrato con un nivel de confianza del 95,0%.

$$L (cm) = \frac{1}{0,62272 + 0,0219303 \times Hg (ppm)} \quad (1)$$

Coefficiente de Correlación = 0,98815  
R-cuadrada = 97,644 por ciento  
Estadístico Durbin-Watson = 1,49347 (P=0,1170)

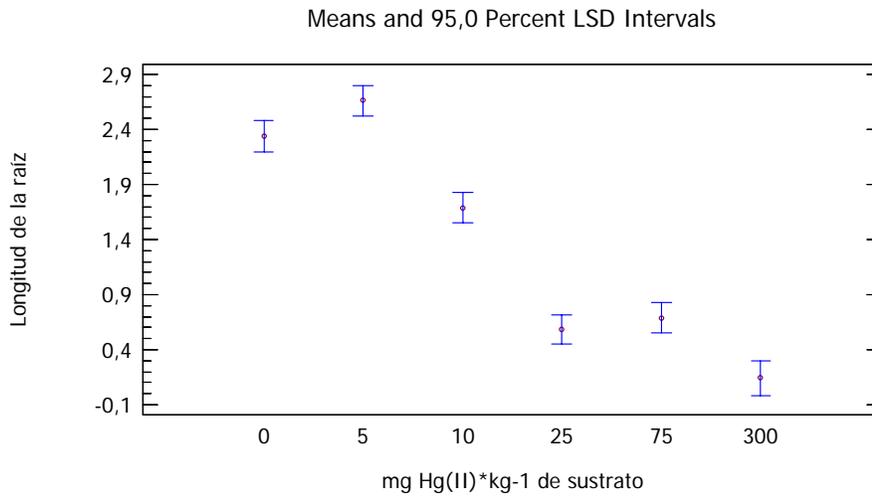


Fig. 1: Test de Fisher. Variaciones en la longitud de la raíz derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg (II)

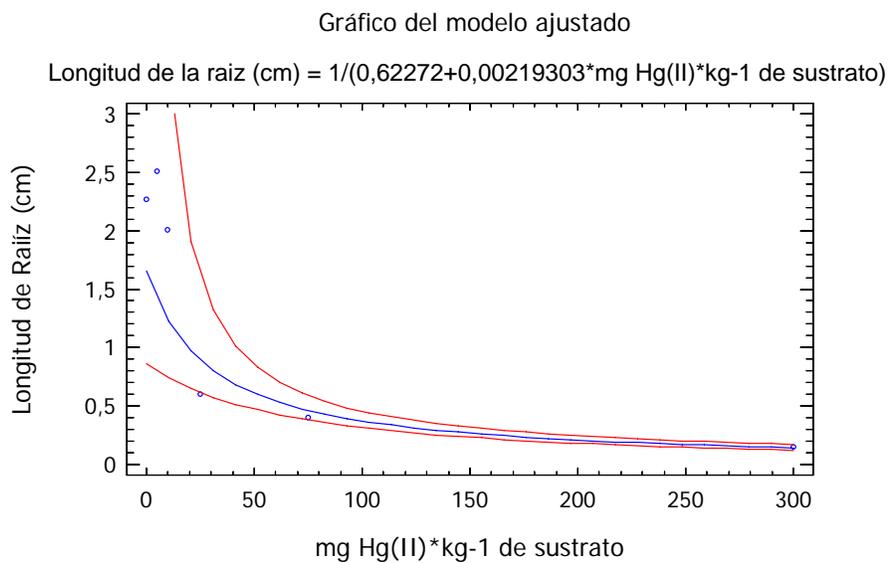


Fig. 2: Regresión Simple. Variaciones en las longitud de la raíz derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II) – Ensayo preliminar

### Determinación de efectos tóxicos en la germinación

El grupo de plantas control alcanzó el 50% de la germinación al día 6, la cinética se estabilizó completamente para todos los grupos a partir del día 16 (Figura 3). Para el punto final del ensayo, las muestras de control alcanzaron un 74% de la germinación, y para los niveles de 5, 10, 25, 50 y 75 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, la germinación fue del 77,3%; 72,0 %; 68,0%; 58,7%; 28,0% respectivamente.

Con la información de la germinación en los días 6 y punto final del ensayo se aplicó el análisis de varianza para encontrar diferencias significativas en el efecto de los niveles de mercurio sobre el tiempo de germinación de semillas de *Brachiaria dictyoneura*.

Para el análisis del experimento completamente al azar correspondiente al día 6 de germinación, se tomaron los niveles de 0, 5, 10, 25, 50 y 75 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, respecto al porcentaje de germinación alcanzado. La ANOVA arrojó un valor-P de 0.000 (Tabla 4) indicando diferencias significativas entre los efectos ocasionados por cada nivel de mercurio en el tiempo de emergencia de las semillas de *Brachiaria dictyoneura*. Adicionalmente se obtuvo la prueba de múltiples rangos (Tabla 5, Tabla 6).

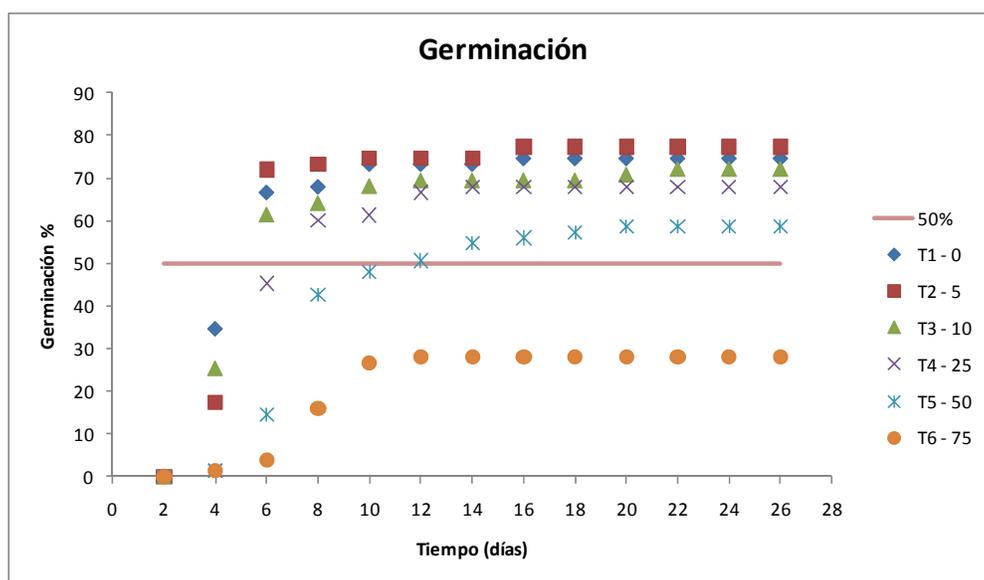


Fig. 3: Cinética de germinación (T: equivale al tratamiento aplicado en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup>)

Tabla 4: ANOVA. Variaciones en % Germinación derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II) en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12181,3	5	2436,27	33,42	0,0000
Intra grupos	874,667	12	72,8889		
Total (Corr.)	13056,0	17			

Con base en la prueba de múltiples rangos (Tabla 5, Tabla 6) y Test de Fisher (Figura 4), se encontró que 50 y 75 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, conforman un grupo homogéneo presentando los valores más bajos de germinación promedio al día 6. Los niveles de control, 5 y 10 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, superan el 50% de la germinación al día 6 y de esta prueba no se infieren diferencias significativas entre los valores medios alcanzados.

Tabla 5: Pruebas de Múltiple Rangos. Variaciones en % Germinación derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II) en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato

mg Hg(II)*kg <sup>-1</sup> de sustrato	Casos	Media	Grupos Homogéneos
75	3	4,0000	X
50	3	14,6667	X
25	3	45,3333	X
10	3	61,3333	X
0	3	66,6667	X
5	3	72,0000	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tabla 6: Pruebas de Múltiple Rangos. Variaciones en % Germinación derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II) en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato. Contrastes

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 10		5,33333	15,1882
0 - 25	*	21,33333	15,1882
0 - 5		-5,33333	15,1882
0 - 50	*	52,0	15,1882
0 - 75	*	62,6667	15,1882
10 - 25	*	16,0	15,1882
10 - 5		-10,6667	15,1882
10 - 50	*	46,6667	15,1882
10 - 75	*	57,3333	15,1882
25 - 5	*	-26,6667	15,1882
25 - 50	*	30,6667	15,1882
25 - 75	*	41,3333	15,1882
5 - 50	*	57,3333	15,1882
5 - 75	*	68,0	15,1882
50 - 75		10,6667	15,1882

\* indica una diferencia significativa.

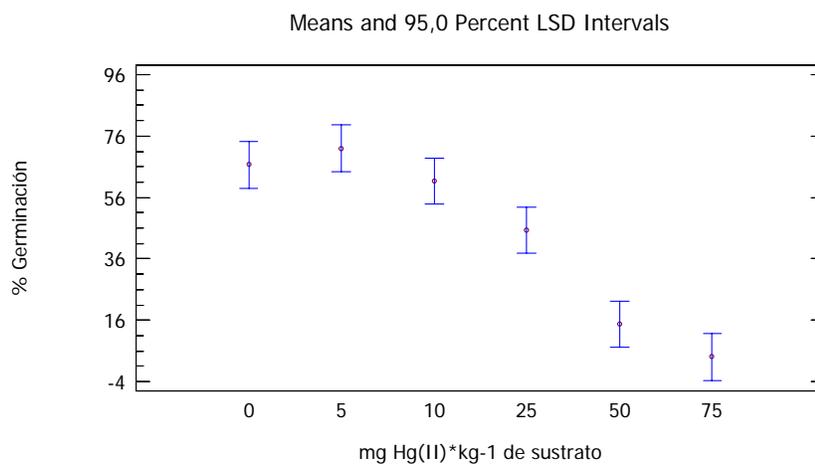


Fig. 4: Test de Fisher Variaciones en % Germinación derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II) en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, día 6

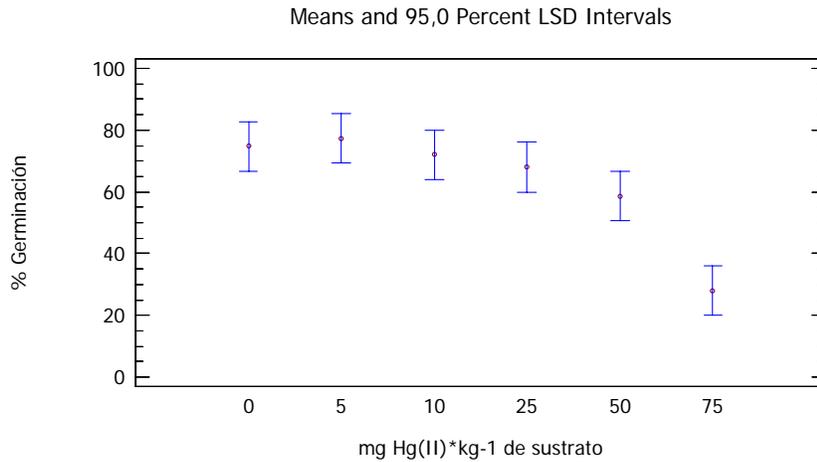


Fig. 5: Test de Fisher. Variaciones en % Germinación derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II) en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato

Para el día final del ensayo se aplicó el análisis de varianza ANOVA como un diseño completamente al azar para el porcentaje de germinación en los diferentes niveles de mercurio aplicados (Tabla 7). La ANOVA arrojó un valor-P de 0.002 indicando diferencias significativas entre los efectos ocasionados por cada nivel de mercurio en el tiempo de emergencia de las semillas de *Brachiaria dictyoneura*.

Al aplicar la prueba de múltiples rangos (Tabla 8, Tabla 9) y Test de Fisher (Figura 5), se encontró que sólo el efecto causado por el nivel 75 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, es estadísticamente significativo, los demás niveles presentan condiciones de homogeneidad.

Tabla 7: ANOVA. Variaciones en % Germinación derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II) en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato – día final

Fuente	Suma Cuadrados	de	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5073,78		5	1014,76	12,28	0,0002
Intra grupos	992,0		12	82,6667		
Total (Corr.)	6065,78		17			

Tabla 8: Pruebas de Múltiple Rangos para % Germinación por mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato

mg Hg(II)*kg <sup>-1</sup> de sustrato	Casos	Media	Grupos Homogéneos
75	3	28,0	X
50	3	58,6667	X
25	3	68,0	X X
10	3	72,0	X X
0	3	74,6667	X X
5	3	77,3333	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tabla 9: Pruebas de Múltiple Rangos. Variaciones en % Germinación derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II) en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato. Contrastes - día final

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 10		2,66667	16,1749
0 - 25		6,66667	16,1749
0 - 5		-2,66667	16,1749
0 - 50		16,0	16,1749
0 - 75	*	46,6667	16,1749
10 - 25		4,0	16,1749
10 - 5		-5,33333	16,1749
10 - 50		13,3333	16,1749
10 - 75	*	44,0	16,1749
25 - 5		-9,33333	16,1749
25 - 50		9,33333	16,1749
25 - 75	*	40,0	16,1749
5 - 50	*	18,6667	16,1749
5 - 75	*	49,3333	16,1749
50 - 75	*	30,6667	16,1749

\* indica una diferencia significativa.

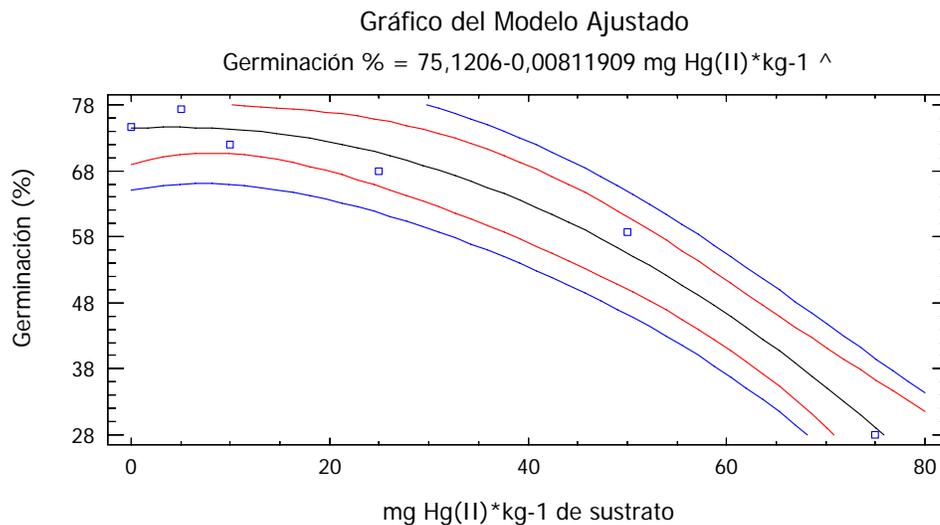


Fig. 6: Regresión Simple - Germinación vs. mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup>

Se obtuvo la regresión (Figura 6) entre los valores de la media observada en la germinación al día final del ensayo y los diferentes niveles de mercurio aplicados. El modelo ajustado resultante es Cuadrado de X de la forma  $Y = a + b \cdot X^2$  (ecuación 2).

$$G (\%) = 75,1206 - 0,00811909 X^2 \tag{2}$$

Donde X equivale a la concentración de Hg II, expresado en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato

Coeficiente de Correlación = -0,990364  
 R-cuadrada = 98,082 por ciento  
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 97,6025 por ciento  
 Estadístico Durbin-Watson = 2,05948 (P=57,6976)

La variable dependiente es el porcentaje de germinación y la variable independiente la concentración de Hg II expresada en partes por mg  $\text{Hg(II)} \cdot \text{kg}^{-1}$  de sustrato. La ANOVA arrojó un valor P de 0,0001 lo que indica que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables analizadas con un nivel de confianza del 95,0%.

#### Determinación de efectos tóxicos en cambios morfológicos

Para esta evaluación se aplicó el análisis por bloques completos al azar, utilizando como niveles de bloqueo la siembra directa de semillas en sustrato contaminado y el trasplante luego de germinar en medio estéril. Se determinó el efecto de la concentración de mercurio en el crecimiento de las raíces y el cambio de biomasa.

#### Efectos en crecimiento de raíces

El análisis de varianza aplicado para los valores de crecimiento de raíz respecto a los niveles de 0, 5, 10, 25, 50 y 75  $\text{mg Hg}^{2+} \text{ kg}^{-1}$  arena, considerando como bloqueo las condiciones de siembra (directa y trasplante); arroja un valor-P de 0,0000 para los niveles de mercurio, indicando diferencias significativas entre los efectos observados (Tabla 10).

Tabla 10: Análisis de Varianza. Variaciones en la longitud de la Raíz derivadas de la aplicación diferentes concentraciones de Hg(II), en  $\text{mg Hg(II)} \cdot \text{kg}^{-1}$  sustrato - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: $\text{mg Hg(II)} \cdot \text{kg}^{-1}$ de sustrato	1246,23	5	249,247	366,22	0,0000
B: Bloque	37,2164	1	37,2164	54,68	0,0000
Interacciones					
AB	35,2622	5	7,05245	10,36	0,0000
Residuos	366,837	539	0,680587		
Total (corregido)	1683,93	550			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

En los gráficos de medias obtenidos para cada réplica, tanto para siembra directa (Figura 7) como para trasplante (Figura 8) se observan valores similares de crecimiento para los niveles 0, 5 y 10  $\text{mg Hg(II)} \cdot \text{kg}^{-1}$  de sustrato, mientras que los niveles 25, 50 y 75  $\text{mg Hg(II)} \cdot \text{kg}^{-1}$  de sustrato, muestran una longitud de raíz bastante reducida respecto al control.

Para los efectos del Bloque con los niveles de siembra directa y trasplante, se obtuvo un valor-P menor a 0,05, se presentó el mismo resultado para las interacciones entre los efectos principales. Los valores medios de longitud de raíz en cada nivel del grupo de plantas de trasplante, fueron inferiores respecto a los de plantas de siembra directa (Figura 9).

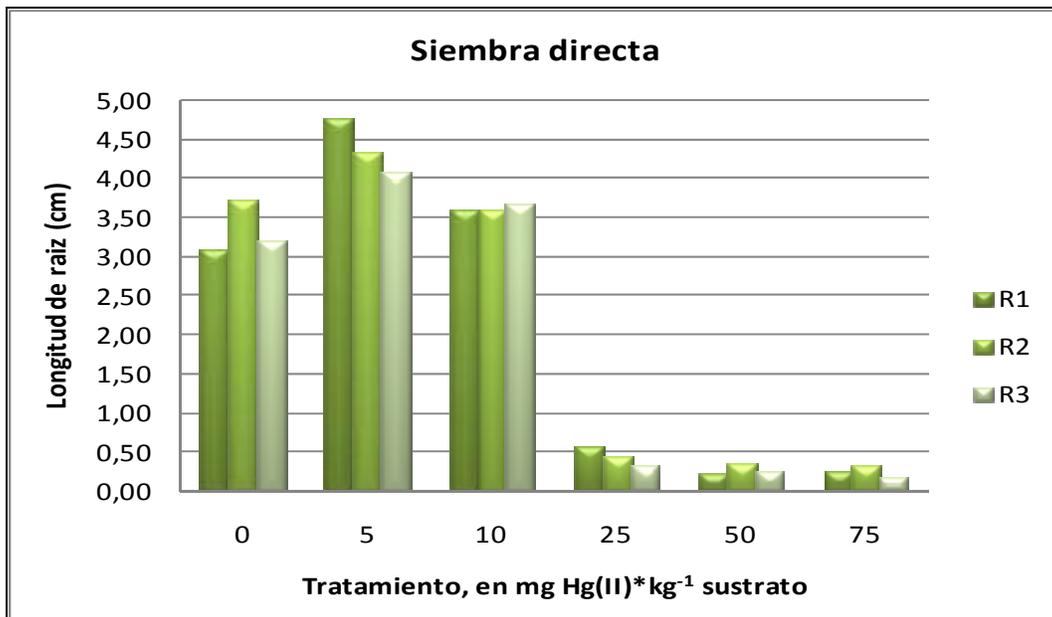


Fig. 7: Variaciones en la longitud de la Raíz derivadas de la aplicación diferentes concentraciones de Hg(II), en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> sustrato. Plantas de siembra directa

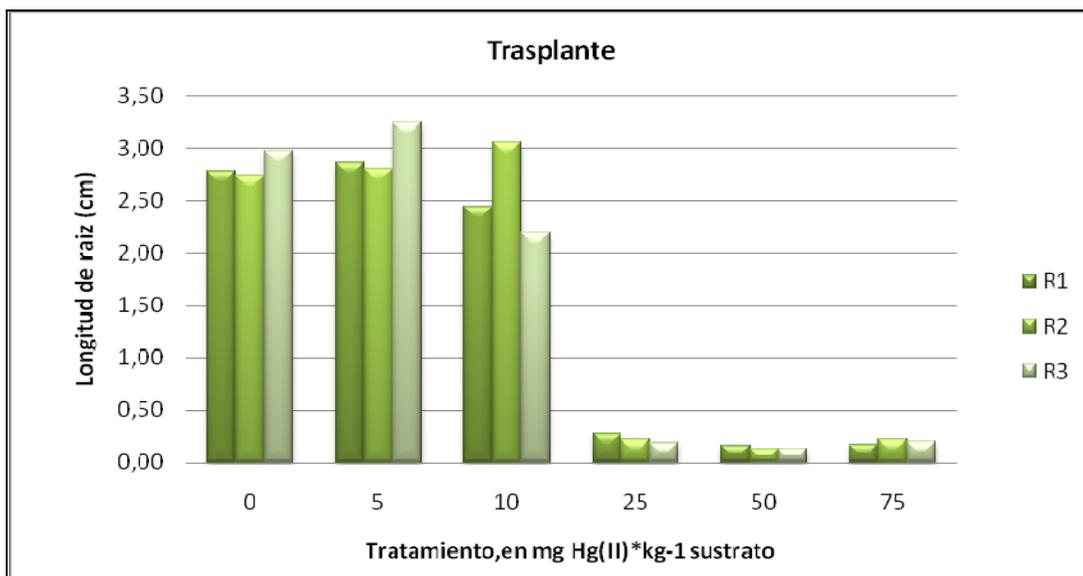


Fig. 8: Variaciones en la longitud de la Raíz derivadas de la aplicación diferentes concentraciones de Hg(II), en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> sustrato. Plantas de trasplante

### Efectos en incremento de la biomasa

El análisis de varianza aplicado (Tabla 11), considera un factor de bloqueo relativo a las condiciones de siembra (directa y trasplante), los resultados muestran para los valores de biomasa seca respecto a los niveles de mercurio se obtiene un valor-P de 0,0000, indicando diferencias significativas entre los efectos observados. El decrecimiento de la biomasa seca respecto a los niveles de mercurio se aprecia en el Test de Fisher (Figura 10).

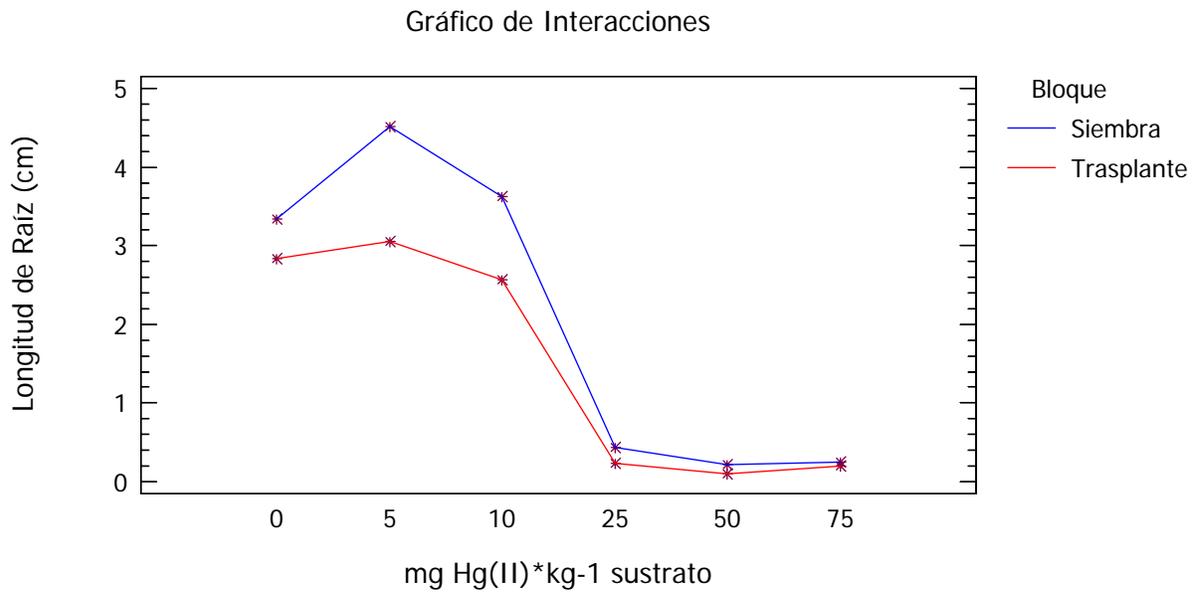


Fig. 9: Interacciones. Variaciones en la longitud de la Raíz derivadas de la aplicación diferentes concentraciones de Hg(II), en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> sustrato.

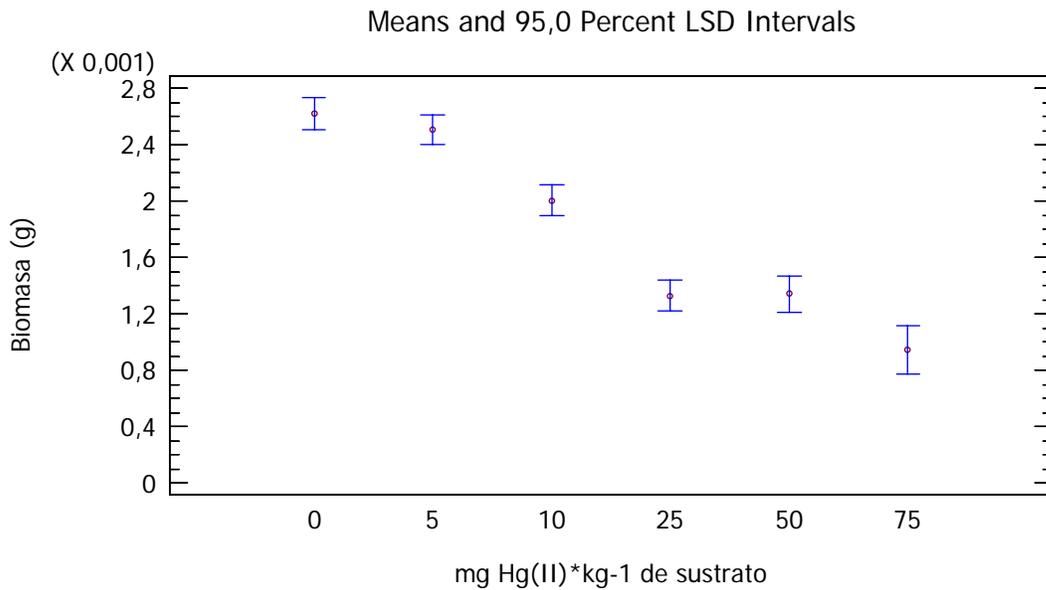


Fig. 10: Test de Fisher. Variaciones de la Biomasa (g) derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II) en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> sustrato

Tabla 11: Análisis de Varianza. Variaciones de la Biomasa (g) derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II) en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> sustrato - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: mg Hg(II)*kg <sup>-1</sup> de sustrato	0,000139026	5	0,0000278052	82,14	0,0000
B: Bloque	0,00000576761	1	0,00000576761	17,04	0,0000
Interacciones					
AB	0,00000451641	5	9,03281E-7	2,67	0,0214
Residuos	0,000188551	557	3,38511E-7		
Total (corregido)	0,000336926	568			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La prueba de múltiples rangos (Tablas 12 y 13), muestra un comportamiento homogéneo para la biomasa seca respecto a los niveles de 0 y 5 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato. 75 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato tuvo en promedio una biomasa seca de 0,8383 mg, siendo la menor 25 y 50 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato conforman un grupo homogéneo mientras que 10 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, presenta diferencias respecto a todos los niveles.

Tabla 12: Pruebas de Múltiple Rangos. Variaciones de la Biomasa (g) derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II) en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> sustrato

mg Hg(II)*kg <sup>-1</sup> de sustrato	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
75	39	0,000838289	0,000093196	X
50	96	0,00132232	0,0000607137	X
25	96	0,00133752	0,0000594331	X
10	121	0,00194306	0,0000533036	X
5	106	0,00227075	0,0000565111	X
0	111	0,00237324	0,0000558829	X

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tabla 13: Pruebas de Múltiple Rangos. Variaciones de la Biomasa (g) derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II), en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> sustrato. Contrastes

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 5		0,000102483	0,000156109
0 - 10	*	0,000430175	0,000151694
0 - 25	*	0,00103572	0,000160241
0 - 50	*	0,00105091	0,000162083
0 - 75	*	0,00153495	0,000213446
5 - 10	*	0,000327691	0,000152589
5 - 25	*	0,000933233	0,000161089
5 - 50	*	0,000948432	0,000162921
5 - 75	*	0,00143247	0,000214084
10 - 25	*	0,000605542	0,000156814
10 - 50	*	0,00062074	0,000158696
10 - 75	*	0,00110477	0,000210886
25 - 50		0,0000151987	0,000166884
25 - 75	*	0,000499232	0,000217115
50 - 75	*	0,000484034	0,000218478

\* indica una diferencia significativa

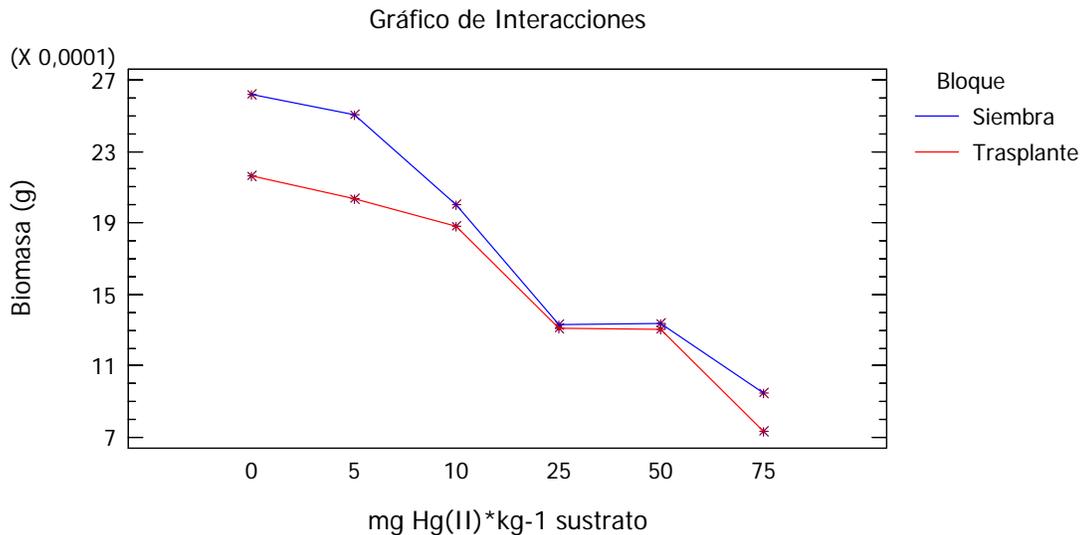


Fig. 11: Interacciones. Variaciones de la Biomasa seca (g) derivadas de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II), en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> sustrato

Los efectos del Bloque con los niveles de siembra directa y trasplante muestran diferencias en el gráfico de interacción (Figura 11), los valores de biomasa seca de las plantas de trasplante son menores a los de siembra directa encada nivel. El análisis ANOVA arrojó valores-P menores a 0,05 tanto para los efectos del Bloque como para la interacción entre los factores.

Se obtuvo la regresión entre los valores de la media observada en la biomasa seca y los diferentes niveles de mercurio aplicados (Figura 12) el modelo resultante es de la forma Raíz Cuadrada de X:  $Y = a + b \cdot \sqrt{X}$  (ecuación 3). Coeficiente de Correlación de -0,965213 y una R-cuadrada de 93,1635%.

$$Biomasa (g) = 0,00248036 - 0,000183584 \cdot \sqrt{X \text{ ppm (Hg II)}} \quad (3)$$

La correlación obtenida en el ensayo preliminar, arroja un estadístico R-Cuadrado indicando que el modelo ajustado explica 97,644% de la variabilidad en Longitud de Raíz cm. El coeficiente de correlación es igual a 0,98815, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Puesto que el valor-P de la prueba de Durbin-Watson es mayor que 0,05, se rechazan posibles desviaciones del modelo por efectos de autocorrelación. Este modelo permitió establecer que los niveles de concentración de mercurio para los ensayos posteriores, se realicen por debajo de 75 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato.

Para la germinación se encontró que la menor concentración con efectos tóxicos observados es 75 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato (valor LOEC), lo que muestra buenas condiciones de respuesta de *Bracharia d.* en comparación con los efectos tóxicos crónicos en germinación en *Lactuca sativa* y *Raphanus sativus*; los cuales aparecen a 7.0 y 51 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato respectivamente (Tipping *et al.*, 2010).

Para longitud de raíz, se encontró un LOEC de 25 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, y para biomasa seca el LOEC es de 10 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato. Se observa una respuesta favorable en comparación con otras gramíneas estudiadas para fitorremediación de mercurio. Los efectos crónicos en biomasa seca para la especie *Cynodon dactylon* son de 8.0 y 25 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato en hojas y tallo, respectivamente (Tipping *et al.*, 2010).

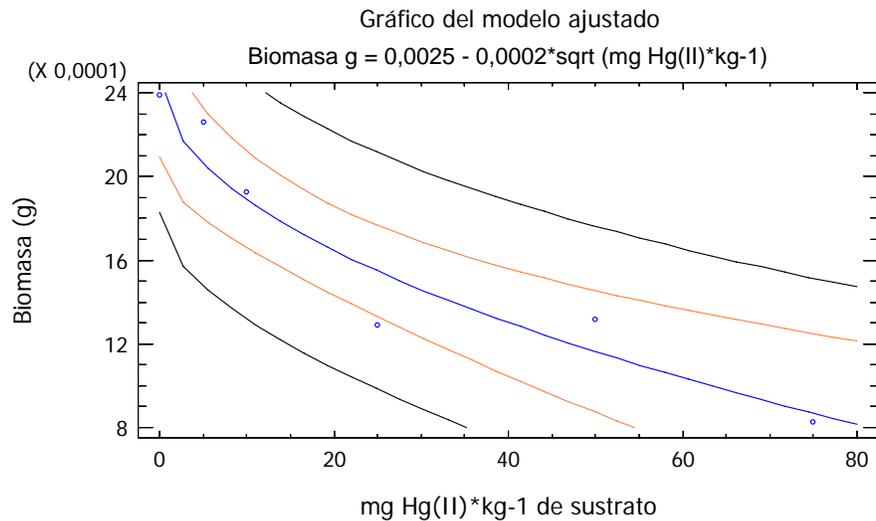


Fig. 12: Regresión Simple. Variaciones de la Biomasa (g) en función de la aplicación de diferentes concentraciones de Hg(II), en mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> sustrato

Niveles de inhibición en biomasa seca entre el 25 y 50% son aceptables para la bioacumulación de mercurio en *Brassica juncea* (Shiyab *et al.*, 2009). Para la especie *Brachiaria dictyoneura* la reducción de biomasa a 25 y 50% se podría dar aproximadamente con concentraciones de 11,4 y 45,6 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato respectivamente, aplicando el modelo obtenido.

El valor-P en la tabla ANOVA en la correlación obtenida entre Germinación % y mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, es menor que 0,05, por lo tanto existe una relación estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95,0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 98,082% de la variabilidad en Germinación %. El coeficiente de correlación es igual a -0,990364, indicando una relación entre las variables, que permite extrapolar un efecto nocivo en la Germinación a una concentración de 75 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato.

En el estudio de la siembra directa y el trasplante se encontró que las que se sembraron directamente al sustrato contaminado obtuvieron mayor crecimiento radicular y de biomasa en cada nivel de mercurio aplicado, en comparación con las semillas que germinaron en medio estéril y luego fueron trasplantadas al medio contaminado; para este ensayo, los análisis por bloques completos aleatorios para longitud de raíz y biomasa presentan un valor-P < 0.05, lo que sugiere que hay diferencias entre los efectos mostrados en cada nivel por cada tipo de siembra. Una incidencia por parte del tipo de siembra sobre el efecto tóxico del mercurio o su efecto de interacción en los cambios morfológicos de *Brachiaria dictyoneura*, debe ser verificada mediante un experimento diseñado para tal fin, ya que la estructura del diseño de bloques no permite hacer este tipo de inferencias respecto a los niveles de cada bloque.

## CONCLUSIONES

Se determinó el efecto del mercurio (II) sobre la germinación, longitud radicular y cambios en biomasa de la especie *Brachiaria dictyoneura*. Se encontró un efecto tóxico significativo sobre el desarrollo radicular a partir de 25 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, un efecto tóxico significativo sobre la biomasa seca a partir de 10 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, y efecto tóxico significativo sobre el tiempo de emergencia de semillas a partir de 75 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato.

Se sugiere trabajar concentraciones que no superen las 25 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, para posteriores estudios a escala de laboratorio sobre la acumulación de mercurio en la especie *Brachiaria dictyoneura*. Con base en los modelos de regresión obtenidos, a 25 mg Hg(II)\*kg<sup>-1</sup> de sustrato, se puede generar una inhibición del 6,8% respecto al control en el proceso de germinación, se podría esperar que la biomasa se reduzca aproximadamente en un 37,0%; estos niveles de inhibición han sido reportados como aceptables en otras especies fitorremediadoras para estudios de acumulación de mercurio.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al equipo de trabajo conformado por los estudiantes, Julián López, Santiago Arenas, Susana Vergara, Santiago Hernández. A la Universidad de Medellín - Vicerrectoría de Investigaciones; por la financiación del mismo y al apoyo del Centro de Investigaciones en Ingeniería de la Institución.

## REFERENCIAS

1. ASTM-E 1963 (2009). Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
2. Bharagava, R.N., Chandra, R. & Rai, V. (2008). Phytoextraction of trace elements and physiological changes in Indian mustard plants (*Brassica nigra* L.) grown in post methanated distillery effluent (PMDE) irrigated soil. *Bioresource Technology*, 99 (17), 8316–8324.
3. do Carmo Alves, J., Pereira de Souza, A., Lima Pôrto, M., Alves de Arruda, J., Tompson Júnior, U. & Batista da Silva, G. (2008). Absorção e distribuição de chumbo em plantas de vetiver, jureminha e algaroba. *Rev. Bras. Cien. Solo*: 32 (3), 1329-1336.
4. Gaona Martínez, X. (2004). *El mercurio como contaminante global. Desarrollo de metodologías para su determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medio ambiente*. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Química, España. Sitio web: <http://hdl.handle.net/10803/3174>
5. Giraldo Buitrago, N., Morales Mira, G.E. & Peláez, C.A. (2006). Desarrollo de un método analítico por Electroforesis Capilar para el estudio de la bioacumulación de mercurio en el modelo *Brachiaria dictyoneura*. III Taller de Microbiología Ambiental y el VII Simposio Latinoamericano de Química Analítica, Ambiental y Sanitaria. Medellín: RACAL.
6. ICONTEC-NTC 4508 (1998); Gestión Ambiental. Calidad del suelo. Determinación de los efectos de contaminantes sobre la flora del suelo. Efectos de productos y químicos sobre la germinación y el crecimiento de las plantas superiores. Editorial: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC. Sitio web: <http://es.scribd.com/doc/50168711/NTC4508>.
7. ICONTEC-NTC 4509 (1998). Gestión ambiental. Calidad del suelo. Determinación de los efectos de los contaminantes sobre la flora del suelo. Método para medir la inhibición del crecimiento de las raíces. Editorial: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC.
8. ICONTEC-NTC 5264 (2008). Calidad del suelo. Determinación del pH. Editorial: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, ICONTEC. Sitio web: <http://es.scribd.com/doc/50503752/NTC5264>.
9. LeDuc, D.L. & Terry, N. (2005). Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32 (11-12), 514-520.

10. Lomonte, C., Doronila, A.I., Gregory D., Baker, A.J. & Kolev, S.D. (2010). Phytotoxicity of biosolids and screening of selected plant species with potential for mercury phytoextraction. *J Hazard Mater.*, 173 (1-3), 494-501.
11. Moreno, F.N., Anderson, C.W., Stewart, R.B., & Robinson, B.H. (2005). Mercury volatilisation and phytoextraction from base-metal mine tailings. *Environmental Pollution*, 136 (2), 341-352.
12. Ramos, C.X., Stévez, S.L. & Giraldo, E. (2000). Nivel de contaminación por metilmercurio en la región de La Mojana. Recuperado el Septiembre de 2009. Sitio web: [http://www.hruschka.com/hgnet/members/claudia/metilmercurio\\_en\\_la\\_mojana.doc](http://www.hruschka.com/hgnet/members/claudia/metilmercurio_en_la_mojana.doc)
13. Shiyab, S., Chen, J., Han, F.X., Monts, D.L., Matta, F.B. & Gu, M. (2009). Phytotoxicity of mercury in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (2), 619-625.
14. Tipping, E., Lofts, S., Frey, B., Spurgeon, D. & Svendsen, C. (2010). Critical Limits for Hg (II) in soils, derived from chronic toxicity data. *Environmental Pollution*, 158 (7), 2465-2471.

