



FITORREMEDIACIÓN CON *SALVINIA MINIMA* (SALVINIACEAE): IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES TEMPORALES DURANTE LA REMOCIÓN DE Cr(VI)

PHYTOREMEDIATION WITH *SALVINIA MINIMA* (SALVINIACEAE): IDENTIFICATION OF TEMPORAL BIOMARKERS DURING Cr(VI) REMOVAL

Noelia R. Taberero¹, Silvana Chocobar Ponce^{1,2}, Carolina Prado^{1,2} & Mariana Rosa^{*1,2}

1. Instituto de Bioprospección y Fisiología Vegetal (INBIOFIV, CONICET-UNT), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

2. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo (IML), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

*rosamd@csnat.unt.edu.ar

Citar este artículo

TABERNEO, N. R., S. CHOCOBAR PONCE, C. PRADO & M. ROSA. 2024. Fitorremediación con *Salvinia minima* (Salviniaceae): identificación de biomarcadores temporales durante la remoción de Cr(VI). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 59: 433-447.

DOI: <https://doi.org/110.31055/1851.2372.v59.n3.44742>

Recibido: 12 Abr 2024
Aceptado: 7 Ago 2024
Publicado en línea: 30 Sep 2024
Publicado impreso: 30 Sep 2024
Editor: Federico Mollard

ISSN versión impresa 0373-580X
ISSN versión on-line 1851-2372

SUMMARY

Background and aims: Heavy metals pollution, particularly by hexavalent chromium, is a topic of global concern due to its high toxicity and environmental persistence. Phytoremediation emerges as a nature-based economic technology for the recovery of environments contaminated by metals. In the case of water bodies, aquatic macrophytes such as *Salvinia minima* Baker are excellent candidates as remedial species. To optimize its use, it is important the identification of efficient and reliable biomarkers. The objective of this work was to carry out a temporal analysis of different biochemical parameters to identify both biomarkers of exposure to Cr(VI) and the most appropriate time for their analysis in *S. minima* plants under laboratory conditions.

M&M: Specimens of *S. minima* were cultured in the presence or absence of hexavalent chromium for seven days under controlled light and temperature conditions. Tissue and culture solution samples were taken at 0, 2, 4 and 7 days. The levels of H₂O₂, malondialdehyde, soluble and insoluble phenols and sucrose were quantified in floating pinnae and submerged rachis. Remaining Cr(VI) was determined in the treatment solution. All determinations were performed spectrophotometrically.

Results: The results allowed us to identify, among the selected parameters, early (malondialdehyde), medium-term (sucrose and insoluble phenols) and late (hydrogen peroxide) biomarkers.

Conclusions: The physiological implications of the observed variations are analyzed and discussed.

KEY WORDS

Biomarkers, heavy metals, remediation, *Salvinia*.

RESUMEN

Introducción y objetivo: La contaminación por metales pesados, y en particular por cromo hexavalente, es un tema de preocupación mundial debido a la alta toxicidad y persistencia ambiental que exhibe este metal. La fitorremediación surge como una tecnología económica para la recuperación de ambientes contaminados por metales. Las macrófitas acuáticas, como *Salvinia minima*, son excelentes candidatas como especies remediadoras de cuerpos de agua. Para optimizar su utilización es importante la identificación de biomarcadores eficientes y confiables. El objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis temporal de distintos parámetros bioquímicos para identificar tanto biomarcadores a la exposición a Cr(VI) como el momento más apropiado para su análisis en plantas de *S. minima* bajo condiciones de laboratorio.

M&M: Se cultivaron ejemplares de *S. minima* en presencia y ausencia de cromo hexavalente, durante siete días, en condiciones controladas de luz y temperatura. Se tomaron muestras de tejidos y de la solución de cultivo a los 0, 2, 4 y 7 días. Se cuantificaron los niveles de H₂O₂, malondialdehído, fenoles solubles e insolubles y sacarosa, en pinnas flotantes y raquis sumergido. En la solución de tratamiento se determinó Cr(VI) remanente. Todas las determinaciones se realizaron espectrofotométricamente.

Resultados: Los resultados permitieron identificar, entre los parámetros seleccionados, biomarcadores tempranos (malondialdehído), de mediano plazo (sacarosa y fenoles insolubles) y tardíos (peróxido de hidrógeno).

Conclusiones: Se analizan y discuten las implicancias fisiológicas de las variaciones observadas.

PALABRAS CLAVES

Biomarcadores, metales pesados, remediación, *Salvinia*.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de cuerpos de agua por metales pesados es uno de los desafíos ambientales más grandes en todo el mundo (Huang *et al.*, 2014; Hama Aziz *et al.*, 2023). El rápido crecimiento de la población y el constante desarrollo industrial, han generado grandes cantidades de residuos con un alto contenido de metales pesados (Wang *et al.*, 2019; Karthik *et al.*, 2021). En particular, la descarga de aguas residuales sin tratamiento o derrames accidentales de estas sustancias, pueden resultar perjudiciales tanto para la biota como para la salud humana debido a que los metales pesados no se degradan y tienen la capacidad de bioacumularse y biomagnificarse a lo largo de las cadenas tróficas (Briffa *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2020a; Velusamy *et al.*, 2022).

Entre los metales pesados, el cromo (Cr) es uno de los contaminantes más estudiados debido a su alta toxicidad y persistencia ambiental (Shanker *et al.*, 2005; Wakeel *et al.*, 2020). Si bien, se encuentra de forma natural y en pequeñas cantidades en el ambiente, su concentración ha ido incrementando debido a distintas actividades tales como la minería, la producción de acero, la fabricación de baterías, el curtido de cuero, la galvanoplastia y los procesos de cromado, entre otros (Wakeel *et al.*, 2020; Karthik *et al.*, 2021). El cromo existe en varios estados de oxidación, pero las formas más estables y comunes en las que se encuentra son: el cromo trivalente Cr(III) y el cromo hexavalente Cr(VI) (Bhalerao & Sharma, 2015), siendo esta última, la forma más tóxica, ya que presenta alto potencial oxidante, alta solubilidad y movilidad a través de las membranas celulares y en el ambiente (Huang *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2020a). En las plantas, uno de los efectos adversos de mayor relevancia es la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), ya que se trata de moléculas altamente reactivas, capaces de oxidar macromoléculas esenciales, tales como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, etc. (Kumar *et al.*, 2019; Ahmad *et al.*, 2019). El estrés oxidativo prolongado provoca alteraciones en la integridad y la funcionalidad de las estructuras celulares que, en la mayoría de los casos, conducen a la muerte celular (Foyer & Noctor, 2005).

El impacto ambiental generado por los metales pesados ha llevado a la comunidad científica a desarrollar diferentes estrategias químicas o

fisicoquímicas para el tratamiento de aguas residuales (precipitación, óxido-reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, etc.). Sin embargo, estos métodos resultan costosos e ineficientes, sobre todo cuando la concentración de metales es muy baja (Azubuike *et al.*, 2016). A esto, se suma la generación de lodos y desechos producidos durante los distintos procesos, dando lugar a un problema de contaminación secundario (Česonienė *et al.*, 2019). Por lo tanto, la gestión sostenible de ambientes contaminados con Cr requiere técnicas de remediación eficientes, sustentables y de bajo costo. En este sentido, se destaca el potencial de la fitorremediación como un sistema de tratamiento de ambientes contaminados basado en el uso de plantas para la remoción de contaminantes. Esta tecnología se caracteriza por ser económica, eficiente y respetuosa con el ambiente, por lo que se ha ido consolidando a lo largo del tiempo, mostrando resultados prometedores (Dixit *et al.*, 2015; Anand *et al.*, 2017; Awa & Hadibarata, 2020).

Las plantas utilizadas en fitorremediación deben seleccionarse en base a algunos criterios: (1) rápido crecimiento, (2) tolerancia a la exposición de contaminantes, (3) capacidad de absorber y acumular distintos tipos de contaminantes, aún si estos se encontraran en muy bajas concentraciones, (3) fácil cosecha y manipulación, (4) resistencia contra plagas y enfermedades y (5) potencial aplicación económica (Timalsina *et al.*, 2022). En base a estas premisas, las macrófitas acuáticas se consideran excelentes candidatas para la remediación de cuerpos de agua contaminados con metales pesados (Miretzky *et al.*, 2004; Espinoza-Quiñones *et al.*, 2008; González *et al.*, 2015; Rezaia *et al.*, 2016; Lewis & Thursby, 2018; Fletcher *et al.*, 2020). En este sentido, estudios llevados a cabo por diferentes investigadores postulan a varias especies del género *Salvinia* como hiperacumuladoras (Espinoza-Quiñones *et al.*, 2009; Llatance Oyarce *et al.*, 2019). En particular, *S. minima* es una especie con alta capacidad depuradora y potencial aplicación en sistemas de tratamiento de aguas contaminadas (Wilson & Al-Hamdani, 1997; Prado *et al.*, 2012, 2015; Chocobar Ponce *et al.*, 2019; Fletcher *et al.* 2020).

Por otra parte, los estudios de monitoreo ambiental precisan de herramientas o marcadores que revelen eficientemente la presencia y la biodisponibilidad de los contaminantes aún a bajas concentraciones. En este sentido, resultan útiles los denominados

bioindicadores y biomarcadores. Estos últimos son parámetros fisiológicos, morfológicos o bioquímicos, cuyos cambios observables y/o medibles revelan la exposición actual o pasada de un organismo a uno o más contaminantes (Melacon, 1995; Khan *et al.*, 2011). Los biomarcadores permiten evaluar de forma temprana los efectos negativos de los contaminantes (múltiples o específicos), aunque estos se encuentren a bajas concentraciones, y predecir las consecuencias de tal exposición (Lam & Gray, 2003; Lam, 2009).

En las últimas décadas, numerosos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en el estudio de los efectos de los contaminantes sobre distintos organismos, a fin de seleccionar los parámetros más adecuados como biomarcadores. En el caso de las plantas, los principales parámetros utilizados son: peroxidación lipídica, variaciones en la relación clorofila/carotenoides, aumento de la concentración de compuestos fenólicos, ácido jasmónico, nicotinamida, compuestos tiólicos, sacarosa, fitoquelatinas y otros péptidos quelantes y aumento de la actividad o inhibición de enzimas antioxidantes (Ferrat *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2011). Si bien se han realizado numerosos estudios para identificar posibles biomarcadores, un aspecto importante que no ha recibido mucha atención es la variación temporal de esos parámetros. Los estudios temporales, además de proporcionar evidencia sobre la presencia de un contaminante o sus productos de degradación, también podrían brindar información sobre su concentración, la persistencia ambiental, los mecanismos de acción, la peligrosidad, entre otros. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis temporal de distintos parámetros bioquímicos (H_2O_2 ; MDA; compuestos fenólicos solubles e insolubles y sacarosa) para identificar posibles biomarcadores tempranos de la presencia de Cr(VI) en plantas de *S. minima*, así como el momento más apropiado para su análisis en un plazo corto de tratamiento. La elección de los parámetros se basó en la sencillez y el bajo costo tanto de la extracción como de la cuantificación de los metabolitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y diseño experimental

Se colectaron ejemplares de *Salvinia minima* Baker de una laguna artificial ubicada en la

Reserva Experimental de Horco Molle, Tucumán (26° 47' 32'' S, 65° 18' 57'' O). Este cuerpo de agua se encuentra aislado, es decir, que solo recibe el agua de lluvia y se usa para abastecer de agua de bebida a los animales de la Reserva. Una vez colectadas, las plantas fueron trasladadas al laboratorio de Fisiología Vegetal-UNT, donde se lavaron con abundante agua destilada para eliminar los restos de sedimentos adheridos a la superficie. Luego, se colocaron en recipientes con agua corriente y se mantuvieron por cinco días en condiciones de laboratorio para su aclimatación. Al cabo de este tiempo, se realizó el ensayo de la siguiente manera: se cultivaron cinco plantas de *S. minima* (aproximadamente 25 g de peso fresco) en bandejas plásticas de 200 ml de capacidad, con agua corriente para los controles y en presencia de 20 mg/L de $K_2Cr_2O_7$ para los tratamientos. Se eligió esta concentración ya que otros estudios informaron concentraciones frecuentes de alrededor de 20 mg/L de sales de cromo (cromato y dicromato) en aguas superficiales y subterráneas contaminadas (Vaiopoulou & Gikas, 2020). Este procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones controladas de temperatura e iluminación (fotoperiodo 12/12, temperatura 24 ± 2 °C, 1054 lux), durante 7 días. La pérdida de agua por evapotranspiración se compensó diariamente agregando agua corriente hasta el volumen inicial. La elección de la duración del ensayo se realizó teniendo en cuenta dos aspectos: la cinética de la remoción de cromo y el tiempo de respuesta de la especie a la presencia del metal (Prado *et al.*, 2012).

Para la determinación de Cr remanente en la solución se tomaron muestras compuestas de la solución de tratamiento según el siguiente procedimiento: cada bandeja se dividió en cuatro cuadrantes. Del centro de cada cuadrante se tomó 1 ml de la solución. Los 4 ml así obtenidos fueron mezclados conformando una sola muestra por bandeja. Este ensayo se realizó por triplicado, es decir que se obtuvieron tres muestras compuestas por cada tratamiento. Para el análisis de los parámetros bioquímicos se tomaron muestras de los tejidos vegetales los días 0, 2, 4 y 7 del ensayo. Las muestras fueron enjuagadas con agua destilada y el remanente fue retirado levemente con papel absorbente. Luego, se separaron cuidadosamente en pinnas flotantes y raquis sumergidos y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Determinación de Cr(VI) en la solución de tratamiento

La determinación de Cr(VI) remanente en la solución de tratamiento se realizó siguiendo el método propuesto por Rüdell & Terytze (1999), el cual se basa en la reducción del Cr(VI) a Cr(III), con la consiguiente oxidación de la 1,5-difenilcarbazona (DFC) a 1,5-difenilcarbazona, la cual reacciona con el Cr(III) para dar un quelato de color violeta, cuya absorbancia se lee a 540 nm. La confiabilidad del método colorimétrico se verificó mediante una curva de calibración hecha a partir de una solución estándar de $K_2Cr_2O_7$ en el rango de concentración de 0,5 mg/L y 50 mg/L de Cr(VI) en presencia y ausencia de Cr(III).

Determinación del Contenido tisular de Cr total

Para cuantificar el contenido de cromo total, las plantas se lavaron con abundante agua destilada a fin de eliminar todo resto de solución de tratamiento y se colocaron sobre papel absorbente a fin de eliminar el exceso de agua. Luego de esto se separaron las plantas en pinnas flotantes y raquis sumergidos y se secaron en estufa a 80 °C hasta peso constante (~48 h). A continuación, se enfrió en desecador y se molieron en un mortero hasta obtener un polvo fino. Para la digestión, a una muestra de 100 mg PS de cada tejido se agregó una mezcla $HNO_3/HClO_4$ (3/1, v/v) y se calentó a 115 °C durante quince minutos según protocolo USEPA 3051 (www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3051.pdf). El contenido de cromo se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer 373, Reino Unido). En los resultados la concentración tisular de cromo fue expresada en mg de Cr total/g PS. El Factor de Translocación se calculó dividiendo el contenido de cromo de las pinnas flotantes sobre el de los raquis sumergidos (Yadav *et al.*, 2009).

Extracción y cuantificación de malondialdehído (MDA)

La extracción y cuantificación de MDA se realizó siguiendo la técnica de Du & Bramlage (1992), con algunas modificaciones. Se homogeneizó 1 g de pinnas flotantes o de raquis sumergido con ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). Los homogenatos se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C y los sobrenadantes

obtenidos se utilizaron para la cuantificación de MDA. A una alícuota del sobrenadante se le añadió ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) en TCA 20% (p/v). La mezcla resultante se calentó en agua hirviendo durante 25 min y luego se enfrió rápidamente en un baño de hielo. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se leyó la absorbancia a 440, 532 y 600 nm. La concentración de MDA se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de 155 mM/cm (a 532 nm para MDA) y se expresó como nmoles equivalentes de MDA por gramo de peso fresco (nmol Eq MDA/g PF).

Extracción y cuantificación del H_2O_2

La extracción de H_2O_2 se realizó en base a la técnica propuesta por Gniazdowska *et al.* (2010), con modificaciones menores. En primer lugar, se homogeneizaron muestras de 1 g de pinnas flotantes o de raquis sumergido con ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) en frío y luego se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4 °C. Al sobrenadante recuperado se le añadió buffer fosfato de sodio (pH 7) y Ioduro de potasio (KI) 10 mM (disuelto en buffer fosfato de sodio pH 7). La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se leyó la absorbancia a 390 nm. La concentración de H_2O_2 se determinó utilizando una curva estándar realizada con una solución madre de H_2O_2 0,892 μ mol/ml y los resultados se expresaron como μ mol de H_2O_2 /g PF.

Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos solubles (FS) e insolubles (FI):

La extracción de FS se realizó según la técnica de Swain & Hillis (1959), con modificaciones menores. Se homogeneizó 1 g de pinnas flotantes o de raquis sumergido con etanol 96% (v/v). Luego, los homogenatos se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente, durante 48 h y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes recuperados se utilizaron para la cuantificación de FS. Para ello, al extracto se le agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu (1:1 v/v) y agua destilada. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 min y se agregó Na_2CO_3 7,5% (p/v). Se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 5 min y se leyó la absorbancia a 760 nm.

Para la obtención de FI, se realizaron algunas modificaciones a la técnica propuesta por Assabgui *et al.* (1993), a partir de la cual, los precipitados recuperados de la extracción de FS se secaron a 40 °C durante 48 h y se hidrolizaron con NaOH 0,5 M (p/v) en un baño de agua hirviendo durante 60 min. Luego, las muestras se enfriaron y se acidificaron con HCl 5 N (p/v) hasta pH 2. Posteriormente, se centrifugaron durante 10 min y al sobrenadante extraído, se le agregó acetona. Las muestras se homogeneizaron y se extrajeron las alícuotas. Los FI se determinaron utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu como se describió anteriormente. Las concentraciones de FS y FI se determinaron utilizando una curva estándar elaborada con una solución madre de fenol y se expresaron como mg equivalentes de fenol por gramo de peso fresco (mg Eq. fenol/g PF).

Extracción y cuantificación de sacarosa

Para cuantificar el contenido de sacarosa, se homogeneizó 1 g de pinnas flotantes o raquis sumergido con etanol 80% (v/v). El homogenato se calentó en un baño de agua a 80 °C durante 10 min y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. Se separó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en etanol 80% (v/v) y se centrifugó nuevamente. Este paso se repitió tres veces. Los sobrenadantes se reunieron y se secaron bajo una corriente de aire caliente. El residuo resultante se resuspendió en agua destilada. Una alícuota de este extracto se utilizó para cuantificar el contenido de sacarosa mediante el protocolo de Cardini *et al.* (1955) y los resultados se expresaron como mg sacarosa/g PF.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental consistió en tres ensayos independientes y consecutivos. Cada ensayo contó con tres réplicas por cada tratamiento (0 y 20 mg/L de $K_2Cr_2O_7$). Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se aplicó la prueba estadística (ANOVA de dos vías). Cuando se obtuvieron diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para un nivel de significancia del 5% ($P < 0,05$). La prueba estadística (ANOVA) y el análisis de normalidad se llevaron a cabo utilizando el software SigmaPlot 12.5 con nivel de significancia de 0,05.

RESULTADOS

Cr(VI) remanente en la solución de tratamiento y contenido de Cr total en tejidos

El perfil temporal del contenido de Cr(VI) remanente en la solución de tratamiento se muestra en la Fig. 1. Se observó una rápida disminución del contenido del metal al día 2 del tratamiento. A partir de ese momento, el contenido de Cr(VI) remanente continuó disminuyendo, pero en forma menos pronunciada, llegando al día 7 con un 25% del contenido inicial de Cr(VI).

En cuanto al contenido tisular de Cr, se observó una progresiva acumulación del metal que mostró un nivel máximo en el día 7, donde ambos órganos mostraron cantidades similares de Cr. En el día 2 y día 4 se observó una mayor acumulación de Cr en el raquis sumergido (Tabla 1).

Parámetros bioquímicos

Con respecto a los parámetros bioquímicos, se observaron diferencias entre sus perfiles temporales y entre los órganos analizados. El contenido de MDA fue ligeramente menor en los raquis sumergidos que en pinnas flotantes (Fig. 2). En ambos órganos los valores de MDA

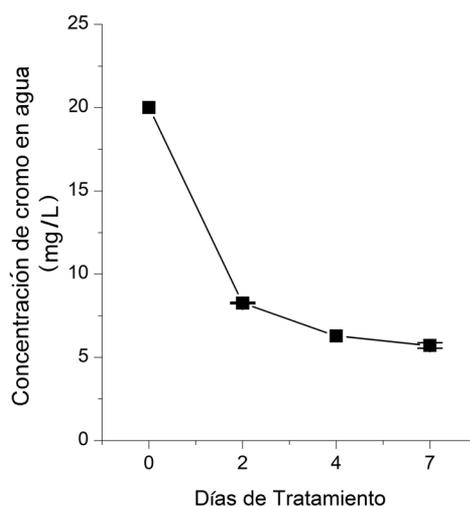


Fig. 1. Variación temporal del contenido de Cr(VI) remanente en la solución de tratamiento. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm DS ($n=3$).

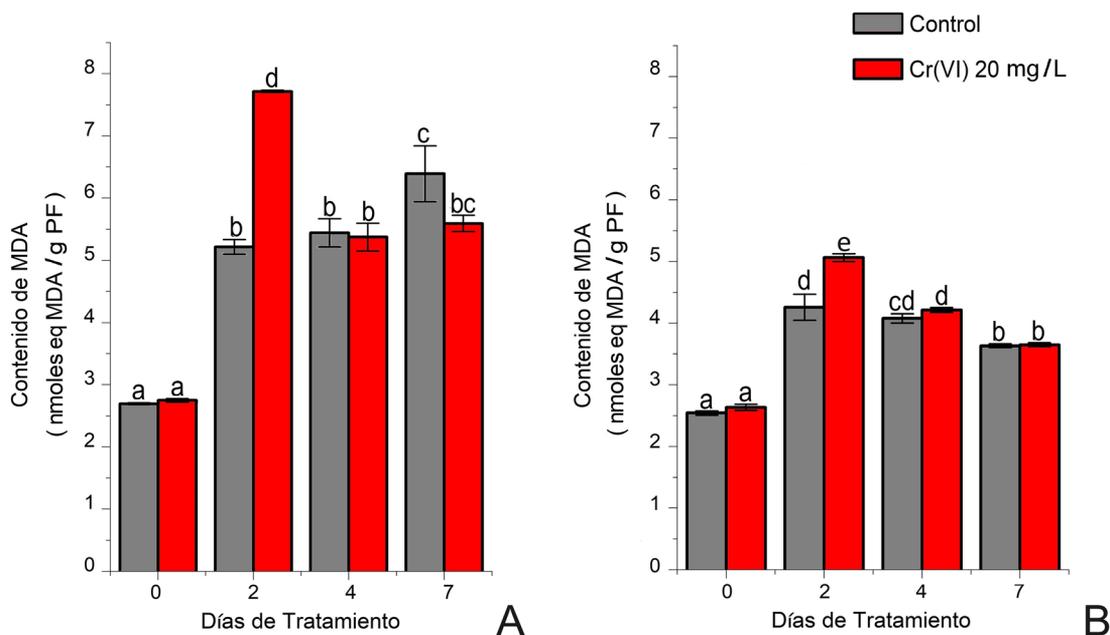
Tabla 1. Contenido de cromo total en órganos de *Salvinia minima* (mg/g PS). Las plantas fueron cultivadas durante siete días en una solución de dicromato de potasio 20 mg/L. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm DS. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los días de tratamiento para el mismo órgano. Letras minúsculas indican diferencias significativas entre órganos para cada día.

	Día 2	Día 4	Día 7
Pinna flotante	0,15 \pm 0.01Aa	0,39 \pm 0.04Ba	1,30 \pm 0.12Cc
Raquis sumergido	0,43 \pm 0.05Ab	0,56 \pm 0.07Ab	1,12 \pm 0.11Bc
Factor de translocación	0.34	0.69	1.08

aumentaron significativamente a partir del día 2. En las pinnas flotantes expuestas a Cr(VI) se observó un pico de acumulación el mismo día, con un 32% de incremento, y a partir de allí, una disminución a valores similares a los de sus respectivos controles (Fig. 2A). En el caso de los

raquis sumergidos, se observó un patrón similar, pero la diferencia observada en el día 2 entre los raquis sumergidos controles y los expuestos al metal, alcanzó solo un 18% de incremento (Fig. 2B).

El contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), por su parte, fue mayor en pinnas flotantes que en el raquis sumergido, tanto en las plantas expuestas al Cr(VI) como en aquellas que no estuvieron en contacto con el metal (Fig. 3). Sin embargo, se observó un patrón diferente entre ambos tipos de hojas. Las pinnas flotantes, independientemente del tratamiento, mostraron un aumento progresivo del contenido de H₂O₂ hasta el día 4. A partir de allí, sólo se observó un aumento significativo en presencia de Cr(VI) (Fig. 3A). En el raquis sumergido, se observó un patrón opuesto en las plantas no expuestas al Cr(VI), con una disminución progresiva en el contenido de H₂O₂ a lo largo del ensayo y, solo al día 2, se observó un mayor contenido de peróxido, el cual no presentó diferencia significativa en relación al día 0 (Fig. 3B).



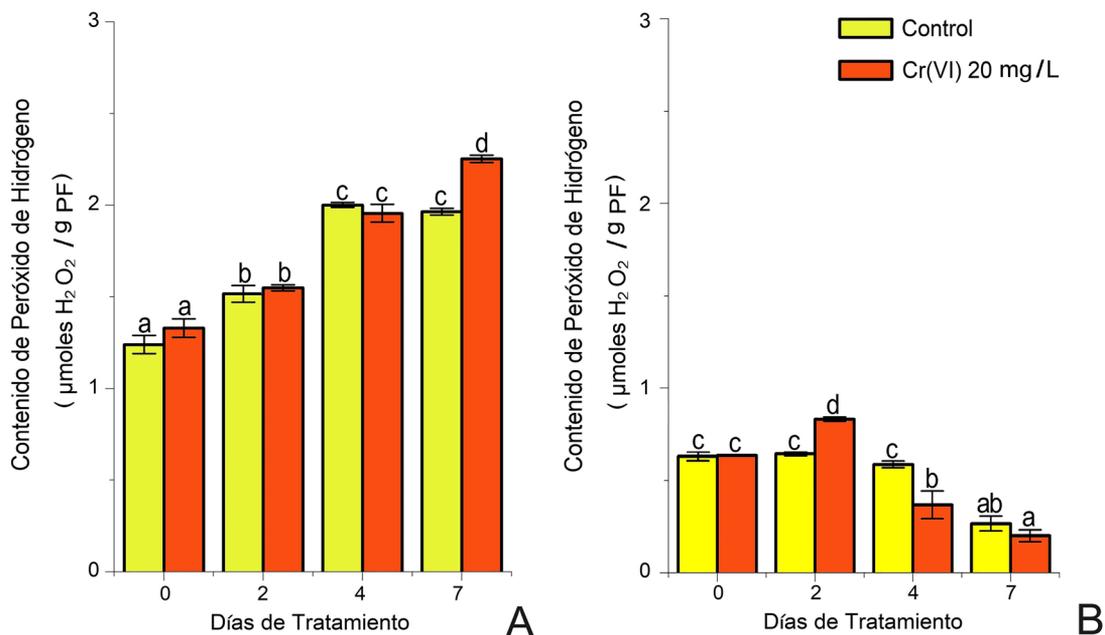


Fig. 3. Variación del contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en plantas de *Salvinia minima*. **A:** pinnas flotantes. **B:** raquis sumergido. Las plantas fueron expuestas a Cr(VI) durante 7 días . Los valores mostrados corresponden al promedio ± DS (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (P < 0,05), (n = 3).

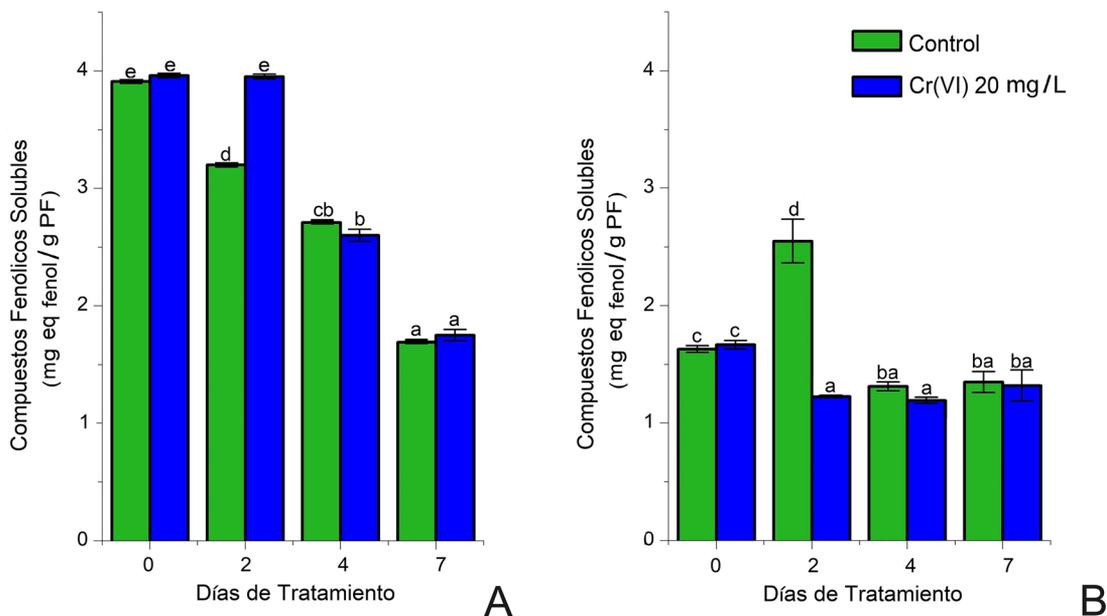


Fig. 4. Variación del contenido de fenoles solubles en plantas *Salvinia minima*. **A:** pinnas flotantes. **B:** raquis sumergido. Las plantas fueron expuestas a Cr(VI) durante 7 días . Los valores mostrados corresponden al promedio ± DS (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (P < 0,05), (n = 3).

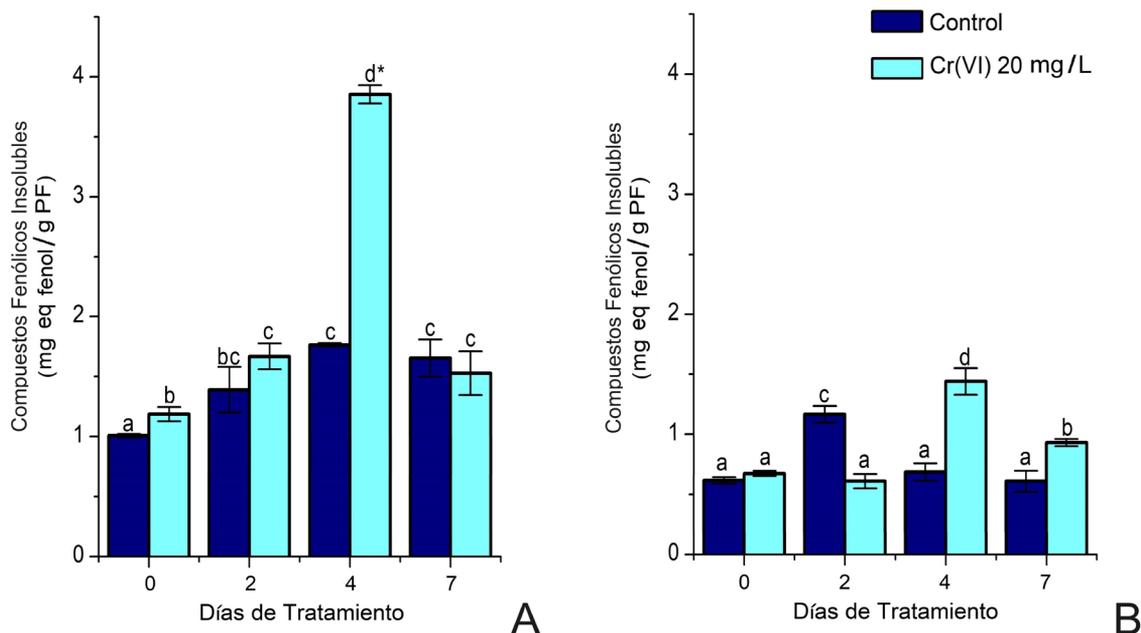


Fig. 5. Variación del contenido de fenoles insolubles en plantas de *Salvinia minima* **A:** pinnas flotantes. **B:** raquis sumergido. Las plantas fueron expuestas a Cr(VI) durante 7 días. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm DS (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$), (n = 3).

Con respecto a los compuestos fenólicos (FS), en general, las pinnas flotantes presentaron mayores contenidos que en el raquis sumergido (Fig. 4 y 5). Los FS mostraron una disminución progresiva en las pinnas flotantes de plantas no expuestas al Cr(VI), mientras que la presencia del metal solo retrasó por 2 días dicha caída (Fig. 4A). En el raquis sumergido se observó un comportamiento diferente, ya que la presencia de Cr(VI) produjo una disminución inicial del contenido de FS pero, a partir de allí, los valores fueron similares a los determinados para los respectivos controles, excepto para el día 2, en el cual se observó un llamativo incremento de FS en raquis sumergidos no expuestos al metal.

Los compuestos fenólicos insolubles (FI), por su parte, mostraron un marcado aumento de su contenido, solo en el día 4, en pinnas flotantes expuestas al Cr(VI), presentando un incremento del 110% comparado con su respectivo control y del 120% comparado con el día 0 (Fig. 5A). En raquis sumergidos, se

observó un pico de acumulación en el día 2 en plantas no expuestas al metal, que mostró un retraso de dos días en presencia de Cr(VI) (Fig. 5B). En este caso, el aumento en los niveles de FI fue de un 100% comparado con su respectivo control y con el día 0.

Por último, los niveles de sacarosa, en general, fueron menores en raquis sumergidos que en pinnas flotantes (Fig. 6). Los resultados obtenidos en pinnas flotantes de plantas expuestas a Cr(VI) mostraron un incremento progresivo del contenido de sacarosa hasta el día 4 (100% con respecto al día 0 y 150% con respecto a su respectivo control) (Fig. 6A). Con respecto a los raquis sumergidos, recién en el día 4 y en el día 7 se observaron diferencias significativas en el contenido de sacarosa entre las plantas expuestas y no expuestas al Cr(VI). La presencia del metal produjo un incremento del 70% en el contenido de sacarosa en raquis sumergidos, comparados con su respectivo control y con el día 0 (Fig. 6B).

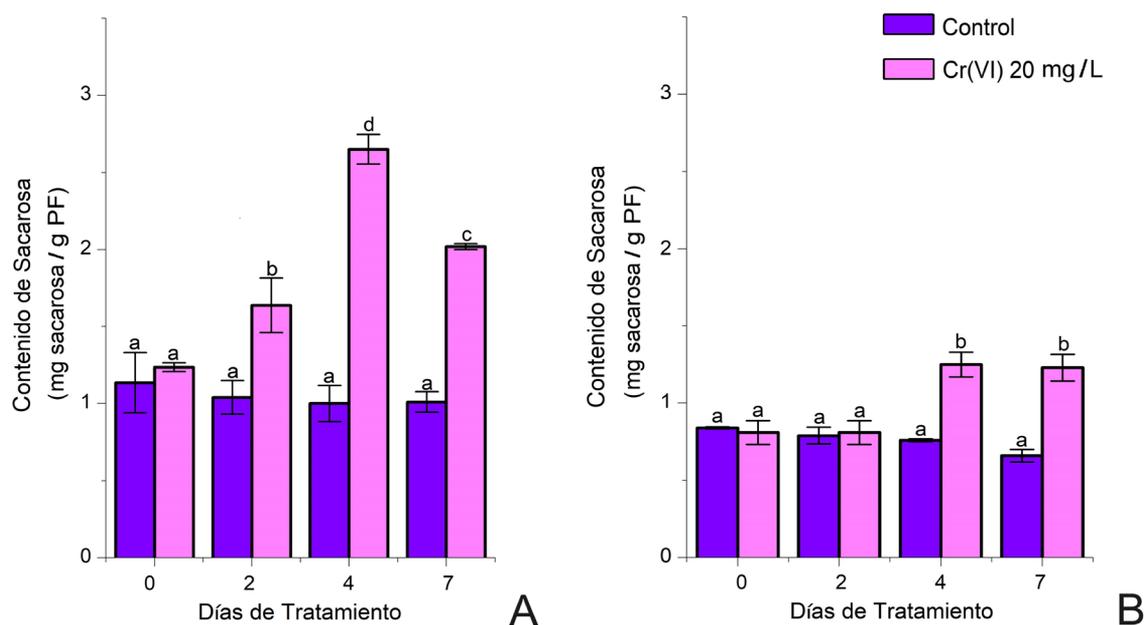


Fig. 6. Variación del contenido de sacarosa en plantas de *Salvinia minima*. **A:** pinnas flotantes. **B:** raquis sumergido. Las plantas fueron expuestas a Cr(VI) durante 7 días. Los valores mostrados corresponden al promedio \pm DS (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$), (n = 3).

DISCUSIÓN

Una vez que los metales pesados, como el cromo, ingresan a la planta, se desencadenan distintos mecanismos de tolerancia y/o defensa, mediante los cuales la planta puede hacer frente a la toxicidad que genera el metal incorporado (Prado *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2017). Esta serie de respuestas metabólicas y fisiológicas pueden ser usadas como biomarcadores. Este concepto fue introducido por Lagadic *et al.* (1994) para referirse a “cambios observables y/o medibles a nivel molecular, bioquímico, celular, fisiológico o de comportamiento, que revelan la exposición actual o pasada de un individuo al menos a un contaminante”. Los biomarcadores representan la respuesta biológica inicial de organismos como las plantas a las perturbaciones o la contaminación en su entorno. Teniendo en cuenta las características de *S. minima* y numerosos estudios que han demostrado su carácter de especie hiperacumuladora (Olguín *et al.*, 2002; Sánchez-Galván *et al.*, 2008; Prado *et*

al., 2012; Dhir, 2013; Chocobar Ponce *et al.*, 2014; Fuentes *et al.*, 2014), se procedió a la evaluación del perfil temporal de remoción de Cr(VI) bajo condiciones de laboratorio, a fin de precisar la cinética del proceso. Los resultados indicaron una disminución significativa del contenido del metal entre los días 2 y 4 del ensayo (Fig. 1), lo cual coincidió con la acumulación de Cr en el raquis sumergido. A partir del cuarto día, el nivel de Cr(VI) en el agua se mantuvo relativamente constante, mientras que, en los tejidos se observó un incremento al día 7. Esto sugirió que bajo nuestras condiciones experimentales hubo translocación desde el raquis sumergido hacia las pinnas flotantes, lo cual se confirmó al calcular el factor de translocación que para el día 7 dió un valor superior a 1. Los valores mostrados en este trabajo resultaron similares a estudios realizados en *S. minima* y otras especies del género (Espinoza-Quiñones *et al.*, 2008; Dhir *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2012; Chocobar Ponce *et al.*, 2019; Parida *et al.*, 2020), e incluso resultaron superiores a los reportados para otras plantas y/o

microorganismos usados en remediación (Olguín *et al.*, 2007; Espinoza-Quñones *et al.*, 2008). Analizando en conjunto este perfil temporal del Cr(VI) remanente en la solución de tratamiento y el contenido tisular de Cr total nos permitió establecer que la mayor parte de la remoción de Cr(VI) ocurre tempranamente y que la duración del ensayo (7 días) era la adecuada para la búsqueda de biomarcadores tempranos en un ensayo de corto plazo. En este sentido, el MDA sería el parámetro de elección para ser evaluado de forma temprana, ya que mostró un pico de acumulación en el día 2, tanto en pinnas flotantes como en raquis sumergidos, con diferencias muy marcadas con respecto al día 0. Para evaluaciones posteriores, se podría sugerir la cuantificación del contenido de compuestos fenólicos insolubles y sacarosa como parámetros relevantes, ya que mostraron picos de acumulación al día 4, en ambos tipos de hoja (Figs. 5, 6). Asimismo, en el día 4 se observó una disminución marcada de los compuestos FS (Fig. 4), por lo que este parámetro, también podría ser considerado como un biomarcador. Por último, para evaluaciones posteriores a los 4-5 días de exposición, el parámetro de elección podría ser el contenido de H₂O₂ en pinnas flotantes, ya que mostró su valor máximo hacia el final del ensayo (Fig. 3).

En cuanto a las implicancias fisiológicas de los resultados obtenidos, es importante resaltar que si bien, pinnas flotantes y raquis sumergidos constituyen un mismo tipo de órgano, el patrón de acumulación de cromo en los tejidos como así también su partición entre órganos mostraron distintos perfiles (Tabla 1). En este sentido, también se evidenciaron diferencias funcionales, metabólicas y de respuesta ante la exposición al cromo; ya que las variaciones de los parámetros bioquímicos analizados no siguieron una relación directa con la concentración del Cr tisular.

La presencia de metales pesados perturba el balance celular entre la generación y eliminación de las ERO. Esto puede desencadenar la peroxidación lipídica, con la consiguiente acumulación de malondialdehído (MDA) en los tejidos de las plantas (González *et al.*, 2014; Fryzova *et al.*, 2018). En base a esto, se ha utilizado este parámetro en varios trabajos como indicador del daño causado por estrés oxidativo en plantas expuestas a metales pesados (Rahman *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2013;

Adrees *et al.*, 2015). En el presente estudio, se observó una señal temprana de daño oxidativo evidenciada en los altos niveles de MDA. Esta señal podría ser interpretada como una fase de alarma que podría desencadenar mecanismos de tolerancia como los observados al día 4, con el aumento en la síntesis de compuestos fenólicos de reconocida actividad antioxidante (Chen *et al.*, 2020) y la acumulación de sacarosa como molécula señal (Rosa *et al.*, 2009) y fuente de esqueleto carbonado para la síntesis de otros compuestos de protección.

En lo referente al efecto del Cr(VI) sobre el contenido de compuestos FS y FI, Chocobar Ponce *et al.* (2014, 2019) y Prado *et al.* (2013), determinaron que en dos especies de *Salvinia*, ambas clases de compuestos resultan afectadas ante la presencia del metal. Teniendo en cuenta su eficiente capacidad antioxidante frente el estrés oxidativo inducido por metales pesados (Urquiaga & Leighton, 2000; Psotová *et al.*, 2003), los elevados niveles de FI en el día 4 y de FS en el día 2, se pueden interpretar como un mecanismo de defensa frente daño oxidativo debido a la presencia de Cr(VI). Por otra parte, se observaron patrones inversos de acumulación, lo que podría indicar fenómenos de polimerización o despolimerización inducidos por el Cr(VI), según los requerimientos de la planta. Así, durante los primeros días de exposición al metal se vería incrementada la síntesis de ácidos fenólicos u otro tipo de compuesto fenólico soluble y, más adelante, éstos podrían ser dirigidos hacia la síntesis de FI, con un pico de acumulación en el día 4 (Fig. 5). Esto podría estar relacionado con una mayor síntesis de lignina, la cual puede conferir mayor resistencia a las paredes celulares y además puede reaccionar con diversos metales a través de sus múltiples grupos funcionales, disminuyendo la cantidad de metal que puede entrar al interior de la célula (Cabane *et al.*, 2012; Riaz *et al.*, 2023). Por otra parte, los compuestos fenólicos también pueden participar indirectamente en la eliminación de ERO, al acoplarse a una actividad de peroxidasa soluble. Es decir que, en ciertas plantas la acumulación de metales pesados induce a la formación de derivados polifenólicos solubles que se acumulan en las vacuolas y actúan como antioxidantes, contribuyendo a la eliminación de los radicales libres que tienden a generar estrés oxidativo (Yamasaki *et al.*, 1997). Estas respuestas sugieren que el contenido de compuestos fenólicos

sería un buen biomarcador para ser utilizado en la evaluación del estado fisiológico de *S. minima* durante su exposición a Cr(VI). Debido a su actividad como moléculas antioxidantes y/o quelantes, su acumulación (sobre todo el día 4), podría constituir un mecanismo de tolerancia del que dispondría esta planta para crecer en ambientes contaminados. Es decir, que la presencia de una variación (aumento/disminución) en sus niveles, sería indicativo de una exposición mayor a tres días.

La relación entre el desequilibrio en el estado celular redox y la fitotoxicidad por metales/metaloides se ha estudiado ampliamente y existen varias revisiones del tema que muestran aumento de ERO (Gratão *et al.*, 2005; Sharma & Dietz, 2008; Mench *et al.*, 2009). Sin embargo, se reportó que cierto nivel de acumulación de ERO, en particular H₂O₂, es necesario para que se disparen los mecanismos de defensa frente a diversas condiciones de estrés (Mithöfer *et al.*, 2004; Foyer & Noctor, 2005; Manara, 2012). En este sentido, se evidenciaron incrementos de los niveles de H₂O₂ en numerosas especies, en respuesta a la presencia de diferentes metales pesados (Cho & Park, 2000; Prado *et al.*, 2013; Chocobar Ponce *et al.*, 2019). De manera similar, nuestros resultados evidenciaron un incremento en la concentración de H₂O₂ en pinnas flotantes expuestas a Cr(VI) (Fig. 3). El mayor contenido se registró en el último día del tratamiento coincidiendo con la mayor acumulación tisular de Cr, por lo que parecería estar más relacionado con un desbalance redox que con una señal.

Según lo reportado por varios autores, la acumulación de Cr(VI) incrementa los niveles de azúcares solubles, almidón y carbohidratos no estructurales (Chocobar Ponce *et al.*, 2019). De acuerdo con esto, nuestros resultados mostraron un aumento en la concentración de sacarosa en presencia del metal en pinnas flotantes y más tardíamente en el raquis sumergido (Fig. 6). Resultados similares se observaron en *Azolla caroliniana* Lam., un helecho acuático cercano a *S. minima*, creciendo en presencia de cromo (Wilson & Al-Hamdani, 1997) y para la propia *S. minima* expuesta a Al (Gardner & Al-Hamdani, 1997). En condiciones normales, la sacarosa sintetizada se transloca a tejidos en crecimiento, donde es hidrolizada por las enzimas invertasa o sacarosa sintasa para producir hexosas las cuales se canalizan hacia el ciclo glucolítico y la vía de las pentosas

fosfato (Devi & Biswas, 2007). Sin embargo, en condiciones de estrés, la síntesis y acumulación de sacarosa podría actuar como sumidero efectivo del exceso de ATP producido por la vía del citocromo (CP), a través de la vía respiratoria alternativa (Solomos & Laties, 1975; Prado *et al.*, 2013). Esta flexibilidad metabólica sería beneficiosa para *S. minima*, ya que le permitiría contar con una reserva de esqueleto carbonado disponible para una mayor síntesis de compuestos protectores o para retomar el crecimiento post-estrés.

CONCLUSIONES

Los resultados aquí presentados demuestran la factibilidad del uso de cuatro parámetros fisiológicos como biomarcadores tempranos de exposición a Cr(VI). Los parámetros seleccionados son fácilmente medibles mediante técnicas espectrofotométricas sencillas y aportan información sobre el estado fisiológico de la planta. Tener un panorama completo de éste es muy importante para la determinación del momento más adecuado para el recambio de plantas durante un proceso de fitorremediación. Los resultados aquí presentados forman parte de estudios tendientes a la caracterización, la optimización y la estandarización del uso de *S. minima* en sistemas de remediación ambiental y aportan herramientas valiosas para el monitoreo de ambientes acuáticos usando técnicas sencillas y económicamente viables.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

NRT realizó la investigación, el análisis formal y visualización de los datos y participó en la redacción, edición y revisión del manuscrito. SCP supervisó los ensayos, colaboró con el análisis formal de los datos y participó en la revisión del manuscrito. CP participó en la conceptualización y supervisión de los ensayos, participó del análisis de los resultados y participó en la redacción, edición y revisión del manuscrito. MR participó en la conceptualización de los ensayos, participó del análisis de los resultados y en la redacción, edición y revisión del manuscrito. Es la titular de los financiamientos que solventaron la investigación.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras del trabajo agradecen el financiamiento otorgado por la Secretaría de Ciencia, Arte e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional de Tucumán (SCAIT - UNT): PIUNT 26G/628.

DATOS DE INVESTIGACIÓN

Los datos que respaldan este estudio están disponibles en el artículo.

BIBLIOGRAFÍA

- ADREES, M., S. ALI, M. IQBAL, S. A. BHARWANA, ... & M. RIZWAN. 2015. Mannitol alleviates chromium toxicity in wheat plants in relation to growth, yield, stimulation of anti-oxidative enzymes, oxidative stress and Cr uptake in sand and soil media. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 122: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.07.003>
- AHMAD, P., D. K. TRIPATHI, R. DESHMUKH, V. P. SINGH & F. J. CORPAS. 2019. Revisiting the role of ROS and RNS in plants under changing environment. *Environ. Exp. Bot.* 161: 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.017>
- ANAND, S., S. K. BHARTI, N. DVIWEDI, S. C. BARMAN & N. KUMAR. 2017. Macrophytes for the reclamation of degraded waterbodies with potential for bioenergy production. En: KULDEEP, B., B. SINGH & J. KORSTAD (eds.), *Phytoremediation Potential of Bioenergy Plants*, pp. 333-351. Springer, Singapore.
- ASSABGUI, R. A., L. M. REID, R. I. HAMILTON & T. ARNASON. 1993. Correlation of kernel (E)-ferulic acid content of maize with resistance to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 83: 949-953.
- AWA, S. H. & T. HADIBARATA. 2020. Removal of heavy metals in contaminated soil by phytoremediation mechanism: a review. *Water Air Soil Pollut.* 231: 47. <http://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
- AZUBUIKE, C. C., C. B. CHIKERE & G. C. OKPOKWASILI. 2016. Bioremediation techniques classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
- BHALERAO, S. & A. SHARMA. 2015. Chromium: As an Environmental Pollutant. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4: 732-746.
- BRIFFA, J., E. SINAGRA & R. BLUNDELL. 2020. Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon* 6: e04691. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
- CABANE, M., D. AFIF & S. HAWKINS. 2012. Lignins and abiotic stresses. *Adv. Bot. Res.* 61: 219-262. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416023-1.00007-0>
- CARDINI, C., L. F. LELOIR & J. CHIRIBOGA. 1955. The biosynthesis of sucrose. *J. Biol. Chem.* 214: 149-155. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)70953-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)70953-8)
- ČESONIENĖ, L., E. MAŽUOLYTĖ-MIŠKINĖ, D. ŠILEIKIENĖ, K. LINGYTĖ & E. BARTKEVIČIUS. 2019. Analysis of biogenic secondary pollution materials from sludge in surface Waters. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16: 4691. <https://doi.org/10.3390/ijerph16234691>
- CHEN, S., R. LIN, H. LU, Q. WANG, ... & C. YAN. 2020. Effects of phenolic acids on free radical scavenging and heavy metal bioavailability in *Kandelia obovata* under cadmium and zinc stress. *Chemosphere* 249: 126-341. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126341>
- CHO, U. & J. PARK. 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Sci.* 156: 1-9. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(00\)00227-2](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(00)00227-2)
- CHOCOBAR PONCE, S., C. PRADO, E. PAGANO, F. E. PRADO & M. ROSA. 2014. Effect of solution pH on the dynamic of biosorption of Cr(VI) by living plants of *Salvinia minima*. *Ecol. Eng.* 74: 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.117>
- CHOCOBAR PONCE, S., C. PRADO, E. PAGANO, F. E. PRADO & M. ROSA. 2019. Effect of pH on Cr(III) accumulation, biomass production and phenolic profile in two *Salvinia* species. *Environ. Toxicol. Chem.* 38: 167-176. <https://doi.org/10.1002/etc.4296>
- DEVI, S. S. & A. R. BISWAS. 2007. Heavy metal status and oxidative stress in diesel engine tuning workers of the central Indian population. *J. Occup. Environ. Med.* 49: 1228-1234. <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e3181565d29>
- DHIR, B. 2013. *Phytoremediation: Role of Aquatic Plants in Environmental Clean-Up*. Springer, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1307-9_2
- DHIR, B., P. SHARMILA, P. P. SARADHI & A. A. NASIM. 2009. Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 72: 1790-1797. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.015>

- DIXIT, R., E. WASIULLAH, D. MALAVIYA, K. PANDIYAN, ... & D. PAUL. 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental process. *Sustainability* 7: 2189-2212. <https://doi.org/10.3390/su7022189>
- DU, D. W. & J. BRAMLAGE. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J. Agr. Food Chem.* 40: 1566-1570.
- ESPINOZA-QUIÑONES, F. R., A. N. MÓDENES, L. P. THOMÉ, S. M. PALÁCIO ... & N. SZYMANSKI. 2009. Study of the bioaccumulation kinetic of lead by living aquatic macrophyte *Salvinia auriculata*. *Chem. Eng. J.* 150: 316-322. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.01.004>
- ESPINOZA-QUIÑONES, F. R., E. A. DA SILVA, M. DE ALMEIDA RIZZUTTO, S. M. PALÁCIO, ... & A. D. KROUMOV. 2008. Chromium ions phytoaccumulation by three floating aquatic macrophytes from a nutrient medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 3063-3070. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9853-9>
- FERRAT, L., C. PERGENT-MARTINI & M. ROMÉO. 2003. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquat. Toxicol.* 2: 187-204. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(03\)00133-4](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(03)00133-4)
- FLETCHER, J., N. WILLBY, D. M. OLIVER & R. S. QUILLIAM. 2020. Phytoremediation using aquatic plants. En: SHMAEFKY, B. R. (ed.), *Phytoremediation. In situ application*, pp. 205-260. Springer, Cham.
- FOYER, C. H. & G. NOCTOR. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28: 1056-1071. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>
- FRYZOVA, R., M. POHANKA, P. MARTINKOVA, H. CIHLAROVA, ... & J. KYNICKY. 2018. Oxidative stress and heavy metals in plants. En: DE VOOGT, P. (ed.), *Reviews of environmental contamination and toxicology*, pp. 129-156. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/398_2017_7
- FUENTES, I. I., F. ESPADAS GIL, M. C. TALAVERA, G. FUENTES & J. M. SANTAMARÍA. 2014. Capacity of the aquatic fern (*Salvinia minima* Baker) of accumulating high concentrations of nickel in its tissues, and its effects on plant physiological processes. *Aquat. Toxicol.* 155: 142-150. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00138-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00138-3)
- GARDNER, J. & S. AL-HAMDANI. 1997. Interactive effects of aluminum and humic substances on *Salvinia*. *J. Aquat. Plant Manag.* 35: 30-34.
- GNIĄZDOWSKA, A., U. KRASUSKA, K. CZAJKOWSKA & R. BOGATEK. 2010. Nitric oxide, hydrogen cyanide and ethylene are required in the control of germination and undisturbed development of young apple seedlings. *J. Plant Growth Regul.* 61: 75-84.
- GONZALEZ, C. I., M. A. MAINE, J. CAZENAVE, G. C. SANCHEZ & M. P. BENAVIDES. 2015. Physiological and biochemical responses of *Eichhornia crassipes* exposed to Cr (III). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 3739-3747. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3558-4>
- GRATÃO, P. L., M. N. V. PRASAD, P. F. CARDOSO, P. J. LEA & R. A. AZEVEDO. 2005. Phytoremediation: green technology for the clean-up of toxic metals in the environment. *Braz. J. Plant Physiol.* 17: 53-64. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100005>
- HAMA AZIZ, K. H., F. S. MUSTAFA, K. M. OMER, S. HAMA ... & K. O. RAHMAN. 2023. Heavy metal pollution in the aquatic environment: efficient and low-cost removal approaches to eliminate their toxicity: a review. *RSC Adv.* 13: 17595-17610. <https://doi.org/10.1039/D3RA00723E>
- HUANG, Z., X. D. PAN, P. G. WU, J. L. HAN & Q. CHEN. 2014. Heavy metals in vegetables and the health risk to the population in Zhejiang, China. *Food Control* 1: 248-252. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.036>
- KHAN, M. A., M. RAM, P. JHA, M. M. AHMAD, ... & M. Z. ABDIN. 2011. Screening and detection of biomarkers in chickpea plants exposed to chromium and cadmium. *J. Environ. Biol.* 32:51-55.
- KARTHIK, V., S. PERIYASAMY, I. J. BEULA & T. TEMESGEN. 2021. Restoration of contaminated agricultural soils. En: THAPAR KAPOOR, R., H. TREICHEL & M. P. SHAH (eds.), *Biochar and its Application in Bioremediation*, pp. 381-401. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4059-9_18
- KUMAR, V., J. SINGH & P. KUMAR. 2019. Heavy metals accumulation in crop plants: Sources, response mechanisms, stress tolerance and their effects. En: KUMAR, V., R. KUMAR, J. SINGH & P. KUMAR (eds.), *Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation*, pp. 38-57. Agro Environ Media, Haridwar. <https://doi.org/10.26832/AESA-2019-CAE>

- LAM, P. K. S. & J. S. GRAY. 2003. The Use of Biomarkers in Environmental Monitoring Programme. *Mar. Pollut. Bull.* 46: 182-186.
[https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00449-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00449-6)
- LAM, P. K. S. 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean Coast. Manag.* 52: 348-354.
<https://10.1016/j.ocecoaman.2009.04.010>
- LAGADIC, L., T. CAQUET & F. RAMADE. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3: 193-208.
- LEWIS, M. & G. THURSBY. 2018. Aquatic plants: test species sensitivity and minimum data requirement evaluations for chemical risk assessments and aquatic life criteria development for the USA. *Environ. Pollut.* 238: 270-280.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.003>
- LLATANCE OYARCE, W., J. EMILIANI, D. BERGARA, L. SALVATIERRA & L. PÉREZ. 2019. Caracterización de los mecanismos de fitorremediación de *Salvinia* sp. frente a la exposición a metales pesados y su impacto sobre la fisiología vegetal. *Energeia* 16: 37-45.
- MANARA, A. 2012. Plant responses to heavy metal toxicity. En: FURINI, A. (ed.), *Plants and heavy metals*, pp. 27-53. Springer, Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-4441-7_2
- MELACON, M. 1995. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. En: HOFFMAN, D. J., A. R. BARNETT, G. A. BURTON Jr. & J. CAIRNS Jr. *Handbook of Ecotoxicology*, pp. 220-240. Lewis Publisher, Florida.
- MENCH, M., J. P. SCHWITZGUEBEL, P. SCHROEDER, V. BERT & S. GUPTA. 2009. Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16: 876-900.
<https://doi.org/10.1007/s11356-009-0252-z>
- MIRETZKY, P., A. SARALEGUI & A. F. CIRELLI. 2004. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere* 8: 997-1005.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.07.024>
- MITHÖFER, A., B. SCHULZE & W. BOLAND. 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Lett.* 566: 1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.011>
- OLGUÍN, E. J., E. HERNÁNDEZ & I. RAMOS. 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 Biotechnol.* 22: 121-131. [https://doi.org/10.1002/1521-3846\(200205\)22:1/2<121::AID-ABIO121>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1521-3846(200205)22:1/2<121::AID-ABIO121>3.0.CO;2-F)
- OLGUÍN, E. J., G. SÁNCHEZ-GALVÁN & T. PÉREZ-PÉREZ. 2007. Assessment of the phytoremediation potential of *Salvinia minima* Baker compared to *Spirodela polyrrhiza* in high-strength organic wastewater. *Water Air Soil Pollut.* 181: 135-147.
- PARIDA, P., K. B. SATAPATHY & A. MOHAPATRA. 2020. Phytoremediation potential of aquatic macrophyte *Azolla pinnata* R. Br. and *Salvinia molesta* Mitchell to remove chromium from waste water. *Plant Arch.* 20: 2595-2601.
- PRADO, C., E. PAGANO, F. E. PRADO & M. ROSA. 2012. Detoxification of Cr(VI) in *Salvinia minima* is related to seasonal-induced changes of thiols, phenolics and antioxidative enzymes. *J. Haz. Mat.* 239-240: 355-361.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.09.010>
- PRADO, C., E. PAGANO, F. E. PRADO & M. ROSA. 2013. Metabolic interconnectivity among alternative respiration, residual respiration, carbohydrates and phenolics in leaves of *Salvinia minima* exposed to Cr(VI). *Environ. Exp. Bot.* 87: 32-38.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.10.005>
- PRADO, C., F. E. PRADO, E. PAGANO & M. ROSA. 2015. Differential effects of Cr(VI) on the ultrastructure of chloroplast and plasma membrane of *Salvinia minima* growing in summer and winter. Relationships with lipid peroxidation, electrolyte leakage, photosynthetic pigments, and carbohydrates. *Water Air Soil Pollut.* 226: 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2284-3>
- PRADO, C., M. ROSA, E. PAGANO, M. HILAL & F. E. PRADO. 2010. Seasonal variability of physiological and biochemical aspects of chromium accumulation in outdoor-grown *Salvinia minima*. *Chemosphere* 81: 584-593.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.033>
- PSOTOVÁA, J., J. LASOVSKÝB & J. VIČARA. 2003. Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed. Papers* 147: 147-153.
<https://doi.org/10.5507/bp.2003.020>
- RAHMAN, M. M., K. S. ISLAM & Y. CHONGLING. 2010. Effect of chromium stress on antioxidative enzymes and malondialdehyde content activities in leaves and roots of mangrove seedlings *Kandelia candel* (L.) Druce. *J. For. Environ. Sci.* 26: 171-179.

- REZANIA, S., S. M. TAIB, M. F. M. DIN, F. A. DAHALAN & H. KAMYAB. 2016. Comprehensive review on phytotechnology: Heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater. *J. Hazard. Mat.* 318: 587-599.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.07.053>
- RIAZ, M. W., M. I. YOUSAF, Q. HUSSAIN, M. YASIR, ... & L. SHAH. 2023. Role of lignin in wheat plant for the enhancement of resistance against lodging and biotic and abiotic stresses. *Stresses* 3: 434-453.
<https://doi.org/10.3390/stresses3020032>
- ROSA, M., C. PRADO, G. PODAZZA, R. INTERDONATO, ... & F. PRADO. 2009. Soluble sugars metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* 5: 388-393.
- ROSA, M., C. PRADO, S. CHOCOBAR-PONCE, E. PAGANO & F. E. PRADO. 2017. Effect of seasonality and Cr(VI) on starch-sucrose partitioning and related enzymes in floating leaves of *Salvinia minima*. *Plant Physiol. Biochem.* 118: 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.05.014>
- RÜDEL, H. & K. TERYTZE. 1999. Determination of extractable chromium (VI) in soils using a photometric method. *Chemosphere* 39: 697-708.
- SÁNCHEZ-GALVÁN, G., O. MONROY, J. GÓMEZ & E. J. OLGUÍN. 2008. Assessment of the hyperaccumulating lead capacity of *Salvinia minima* using bioadsorption and intracellular accumulation factors. *Water Air Soil Pollut.* 194: 77-90.
<https://doi.org/10.1007/s11270-008-9700-5>
- SHANKER, A. K., C. CERVANTES, H. LOZA-TAVERA & S. AVUDAINAYAGAM. 2005. Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31: 739-53.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.02.003>
- SHARMA, A., D. KAPOOR, J. WANG, B. SHAHZAD, ... & D. YAN. 2020. Chromium bioaccumulation and its impacts on plants: an overview. *Plants* 9: 100.
<https://doi.org/10.3390/plants9010100>
- SHARMA, S. S. & K. J. DIETZ. 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Plant Sci.* 14: 43-50.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.007>
- SOLOMOS, T. & G. G. LATIES. 1975. The mechanism of ethylene and cyanide action in triggering the rise in respiration in potato tubers. *Plant Physiol.* 55: 73-78.
- SWAIN, T. & W. E. HILLIS. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The analysis of tissues of the Victoria plum tree. *J. Sci. Food Agr.* 10: 63-68.
- TIMALSINA, H., T. GYAWALI, S. GHIMIRE & S. R. PAUDEL. 2022. Potential application of enhanced phytoremediation for heavy metals treatment in Nepal. *Chemosphere* 306: 135581.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135581>
- URQUIAGA, I. & F. LEIGHTON. 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res.* 33: 55-64.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602000000200004>
- VAIOPOULOU, E. & P. GIKAS. 2020. Regulations for chromium emissions to the aquatic environment in Europe and elsewhere. *Chemosphere* 254: 126876.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126876>
- VELUSAMY, K., S. PERIYASAMY, P. S. KUMAR, G. RANGASAMY, ... & D. V. NGUYEN VO. 2022. Biosensor for heavy metals detection in wastewater: A review. *Food Chem. Toxicol.* 168: 113307. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113307>
- WAKEEL, A., M. XU & Y. GAN. 2020. Chromium induced reactive oxygen species accumulation by altering the enzymatic antioxidant system and associated cytotoxic, genotoxic, ultrastructural, and photosynthetic changes in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 728.
<https://doi.org/10.3390/ijms21030728>
- WANG, Q., H. LI, Y. ZHANG, X. WANG, ... & W. QU. 2019. Evaluations of submarine groundwater discharge and associated heavy metal fluxes in Bohai Bay, China. *Sci. Total Environ.* 695: 133873.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133873>
- WILSON, G. & S. AL-HAMDANI. 1997. Effect of chromium (VI) and humic substances on selected physiological responses of *Azolla caroliniana*. *Am. Fern J.* 87: 17-27.
- YADAV, S. K., A. A. JUWARKAR, G. P. KUMAR, P. R. THAWALE, ... & T. CHAKRABARTI. 2009. Bioaccumulation and phytotranslocation of arsenic, chromium, and zinc by *Jatropha curcas* L.: impact of dairy sludge and biofertilizer. *Bioresour. Technol.* 100: 4616-4622.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.062>
- YAMASAKI, H., Y. SAKIHAMA & N. IKEHARA. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* 115: 1405-1412.

