



Proyecto de fitorremediación en el laboratorio escolar

Este trabajo es una colaboración de las docentes Silvia Cerdeira, Lucía Saenz Briones y Liliana Haim, quienes se desempeñan en la Fundación Escuelas San Juan del Partido de San Isidro, Prov. Buenos Aires en el nivel Polimodal. Los experimentos presentados en este cuaderno fueron realizados por sus alumnos 2º y 3º año Polimodal.

Introducción

Las asignaturas del área de Ciencias Naturales en la escuela secundaria o polimodal tienen como objetivo enseñar los contenidos conceptuales de biología, química y física pero además, lograr la alfabetización científica de los alumnos. La alfabetización científico-tecnológica se extiende más allá del programa y de su vocabulario, así como también de los esquemas conceptuales y de los métodos procedimentales. Esta disciplina trata de desarrollar en los alumnos habilidades de análisis y evaluación de datos científicos con el objetivo final de resolver problemas concretos que afectan a la sociedad.

La planificación y realización de proyectos de investigación que abarquen las tres disciplinas de la ciencia (biología, química y física) persigue los siguientes objetivos:

- Ejercitar la conexión e integración entre las tres áreas de la ciencia.
- Proporcionar oportunidades para explorar soluciones científicas a problemas ambientales.
- Desarrollar la creatividad dentro de un contexto global que estimule y desafíe intelectualmente a los estudiantes.
- Capacitar a los estudiantes para que apliquen los conocimientos, métodos y técnicas característicos de la ciencia y la tecnología en un proyecto de investigación.
- Generar una toma de conciencia sobre el valor y la necesidad de colaborar en las actividades científicas y de comunicarlas de manera eficaz.
- Favorecer la comprensión de las implicancias morales, éticas, sociales, económicas y medioambientales del uso de la ciencia y la tecnología

En este marco, se propuso a los alumnos investigar qué es la fitorremediación y cómo podría resolver la contaminación con iones cobre (II) de aguas y suelos. Se eligió la fitorremediación por ser una tecnología emergente que utiliza plantas para descontaminar aire, suelos, sedimentos, aguas superficiales y aguas subterráneas de metales tóxicos, toxinas orgánicas y otros compuestos contaminantes (ver Cuaderno N° 36).

Esta tecnología o técnica de descontaminación es efectiva, no intrusiva y de bajo costo. De hecho, es la alternativa que ofrece la relación costo-beneficio más conveniente respecto de los métodos mecánicos o químicos para remover sustancias o compuestos peligrosos del suelo. Por otra parte, es estética y naturalmente amigable con el ambiente, por lo que se presenta como una forma de descontaminación socialmente aceptable para las comunidades circundantes y para los organismos reguladores.

La fitorremediación presenta numerosas ventajas ya que funciona en una amplia variedad de sitios y sobre innumerables contaminantes. Actuando como filtros o trampas, las plantas pueden degradar los contaminantes orgánicos, extraer los contaminantes metálicos o contener y estabilizar su movimiento.



La fitorremediación se ha probado activamente desde principios de la década de los noventa, y está en aumento. Hay pruebas a escala completa o de demostración en más de 200 proyectos en todo el mundo.

La fitorremediación se ha aplicado con cierto éxito en tuberías, vertederos industriales y municipales, campos agrícolas, antiguas plantas madereras, establecimientos militares, áreas para tanques de almacenamiento de combustible, plantas de municiones del ejército, plantas de tratamiento cloacal y minas. Los primeros usos de la fitorremediación, a mediados de los años 90, fueron enfocados a la extracción de metales pesados acumulados en el suelo,

Entre los posibles contaminantes, se eligió el ion de cobre (II) porque todos los compuestos de este ion deberían tratarse como si fueran tóxicos. Una cantidad de 30 g de sulfato de cobre (II) es potencialmente letal para una persona. El agua con niveles superiores a 1 mg/l puede ensuciar con cobre las ropas y objetos lavados con ella y aquellas que contengan más de 5 mg/l provocan la aparición de color en el agua y le confieren un sabor desagradable. La OMS en la *Guía para la calidad del agua potable* recomienda un nivel máximo de 2 mg/l de ion cúprico, valor adoptado por la Unión Europea como valor límite, mientras que en EE.UU. la Agencia de Protección Ambiental ha establecido un valor superior de 1,3 mg/l. Las actividades mineras son las mayores fuentes de la contaminación de ríos y aguas subterráneas con iones metálicos, siendo el cobre uno de ellos. Además, la contaminación de suelos agrícolas por el ion cobre, se debe al empleo de determinados plaguicidas en la producción de frutales y hortalizas.

El sulfato de cobre (II) tiene color azul y la intensidad del color de sus soluciones es directamente proporcional a la concentración de dicha sal. Es decir que se cumple la ley de Lambert – Beer en un amplio rango de concentraciones. Esta propiedad permite utilizar métodos colorimétricos para determinar la cantidad de estos compuestos metálicos en muestras desconocidas.

Actividad Nº 1. Plantas que extraen cobre

Objetivo: El objetivo de esta actividad de laboratorio es la aplicación práctica de los principios de fitorremediación en el laboratorio escolar para extraer contaminantes no biodegradables del medio ambiente.

Las habilidades cuyo desarrollo se promueve a partir de esta actividad son:

- Evaluación de un procedimiento experimental
- Utilización de experimentos de referencia y control de variables
- Interpretación de resultados
- Construcción de gráficos a partir de datos experimentales
- Integración de contenidos de física, química y biología (colorimetría, soluciones, ecología, fisiología y anatomía de plantas, etc.)

Experiencia de laboratorio

Objetivos:

- ✓ Determinar la capacidad de absorción del ion cúprico (Cu^{2+}) en solución, de dos especies de plantas acuáticas, *Lemna minor* y *Azolla pinnata*, utilizando métodos colorimétricos.
- ✓ Relacionar los resultados con su aplicación en la fitorremediación de aguas contaminadas.



Hipótesis:

- Las plantas *Lemna minor* y *Azolla pinnata* cultivadas en una solución acuosa de sulfato de cobre (II) absorben los iones cúpricos de la solución.
- La intensidad de color (absorbancia) de las soluciones donde crecen las plantas acumuladoras de iones cúpricos decrece a medida que transcurre el tiempo debido a que este parámetro es directamente proporcional a la concentración de los solutos coloreados en la solución.
- Las especies de plantas acuáticas *Lemna minor* y *Azolla pinnata* son plantas útiles en fitorremediación.

Materiales:

- Plantas de tipo *Lemna minor* y *Azolla pinnata*.
- Solución madre de sulfato de cobre (II) $0,25 \text{ moles dm}^{-3}$ ($0,5 \text{ dm}^3$)
- Matraces aforados (uso opcional dependiendo el grado de precisión que se requiera) o probetas para realizar al menos 3 diluciones consecutivas 1:2 ($0,125 \text{ moles dm}^{-3}$, $6,25 \times 10^{-2} \text{ moles dm}^{-3}$, $3,13 \times 10^{-2} \text{ moles dm}^{-3}$). Se necesitarán $0,3 \text{ dm}^3$ de cada solución.
- Pipetas
- Balanza de precisión
- Agua destilada
- 10 Erlenmeyers de 250 cm^3
- Tapones de algodón o tapones de goma agujereados con un tubo tapado con algodón que permita el intercambio de gases, pero evite la entrada de contaminantes del ambiente.
- Colorímetro. En caso de no contar con este instrumento, puede ser reemplazado por una escala colorimétrica que consiste en una gradilla de tubos de ensayos con un amplio rango de concentraciones de soluciones standard de sulfato de cobre (II).

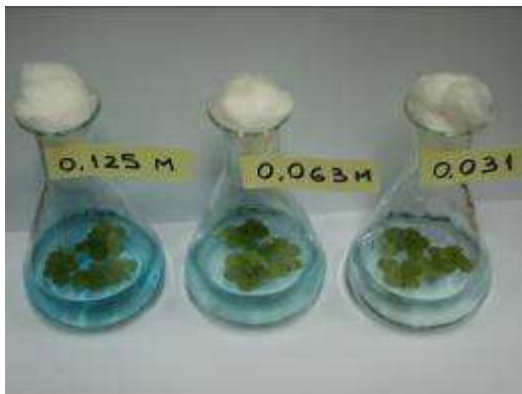
Procedimiento

1. Cultivar *Azolla pinnata* en una pecera aireada hasta tener cantidad suficiente para la experiencia (aproximadamente 250 g).
2. Transferir 3 g de plantas a cada uno de los 10 erlenmeyers.
3. Agregar 150 cm^3 de las soluciones de sulfato de cobre (II) según el protocolo de la Tabla N° 1 a los erlenmeyers conteniendo las plantas (siempre se trabajará por duplicado). Taparlos con el tapón y colocarlos en una mesa cerca de la ventana para que tengan una buena iluminación. (ver Foto N° 1)

Tabla N° 1: Protocolo

| Número de Erlenmeyer | Composición y concentración (moles dm^{-3}) |
|----------------------|--|
| 1 y 2 | Sulfato de cobre (II), 0,250 |
| 3 y 4 | Sulfato de cobre (II), 0,125 |
| 5 y 6 | Sulfato de cobre (II), $6,25 \times 10^{-2}$ |
| 7 y 8 | Sulfato de cobre (II), $3,13 \times 10^{-2}$ |
| 9 y 10 | Agua destilada |

Foto N° 1: Plantas acuáticas en soluciones de sulfato de cobre (II)



4. Si se utiliza un colorímetro:

- Representar el espectro de absorción del sulfato de cobre, es decir medir la absorbancia de la solución más diluida cada 20 nm (Ver Grafico N° 1).
- Seleccionar la/las longitud/es de onda más adecuada/s para medir con precisión
- Realizar una curva de calibración a dichas longitudes de onda: medir la absorbancia de las soluciones preparadas y graficar absorbancia en función de concentración (ver Grafico N° 2)

Absorbancia es la medida de la cantidad de luz absorbida por una solución, y es proporcional a la concentración. Se la determina con un colorímetro o espectrofotómetro. El término **absorción** se refiere al proceso físico de absorber luz. En el caso de una solución, la absorbancia mide absorción. Cuando se hacen gráficos de absorbancia vs. concentración, se habla de **curvas de absorción**.

Grafico N° 1: Espectro de absorción

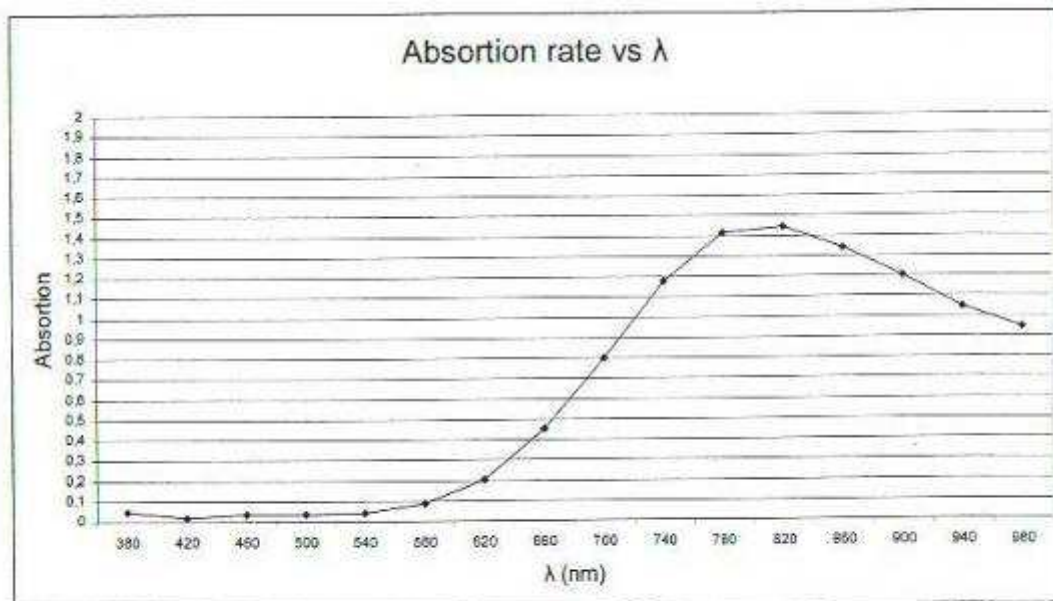
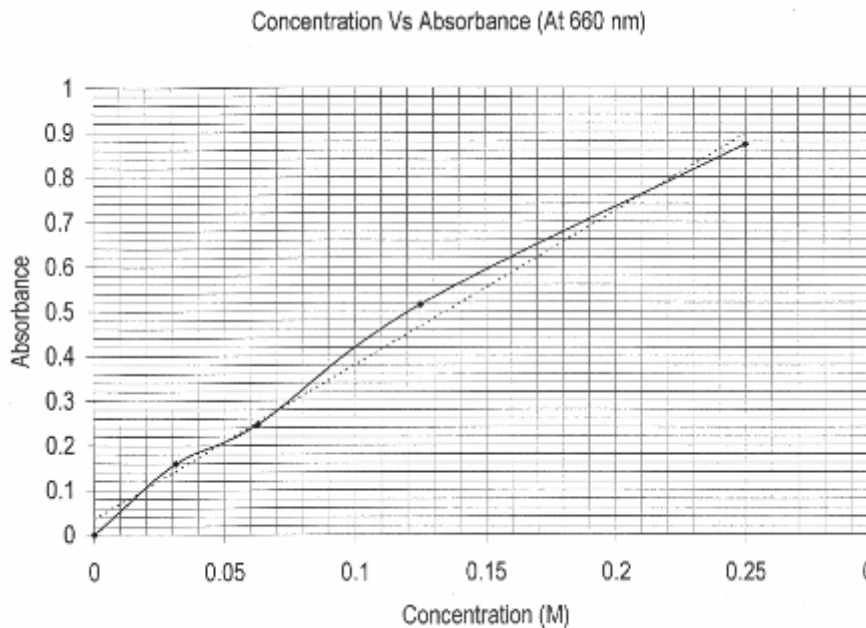


Table.

| λ(nm) | 380 | 420 | 460 | 500 | 540 | 580 | 620 | 660 | 700 | 740 | 780 | 820 | 860 | 900 | 940 | 980 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 0.049 | 0.018 | 0.036 | 0.032 | 0.043 | 0.085 | 0.204 | 0.454 | 0.802 | 1.178 | 1.414 | 1.446 | 1.340 | 1.202 | 1.044 | 0.943 |

Espectro de absorción del sulfato de cobre. El gráfico representa la variación en la absorción en función de la longitud de onda representada por la letra griega lambda (λ), y expresada en nanómetros. Los valores que se representan en el gráfico se muestran en la tabla.

Grafico N° 2: Curva de calibración



Absorbancia de las soluciones de cobre a 660 nm en función de su concentración.

5. Si no se cuenta con un colorímetro: construir una escala de color utilizando las soluciones del experimento y sus diluciones. De esta manera se podrá tener una medida cuantitativa aproximada de la capacidad de absorción del ion en solución estudiado.
6. Determinar el valor inicial de absorbancia de cada una de las muestras o el color y coincidencia con el patrón de color.
7. Dejar las muestras en las mismas condiciones por 10 días y repetir el paso anterior.
8. Recolectar datos por un mes en intervalos de 10 días.
9. Calcular la variación de absorbancia y/o concentración en estos períodos. Construir una tabla con los resultados y a partir de ellos realizar un gráfico para mostrar la variación (Grafico N° 3).

Variables

- Independiente: las concentraciones iniciales de iones cúprico.
- Dependientes: la velocidad de absorción por las plantas.
- Controladas: se debe tener el mismo suministro de luz y oxígeno durante todo el experimento (se utilizó el mismo lugar físico para todo el experimento). La temperatura, la presión y la humedad tendrían que controlarse, se las dejó en el mismo ambiente en las condiciones ambientales durante un mes (se aproxima más a la situación real donde serán colocadas estas plantas).

Resultados:

Los resultados que se muestran son a modo de ejemplo y fueron obtenidos por nuestros alumnos.

Grafico N° 3: Variación de absorbancia de la solución 0,125M con el tiempo a diferentes longitudes de onda

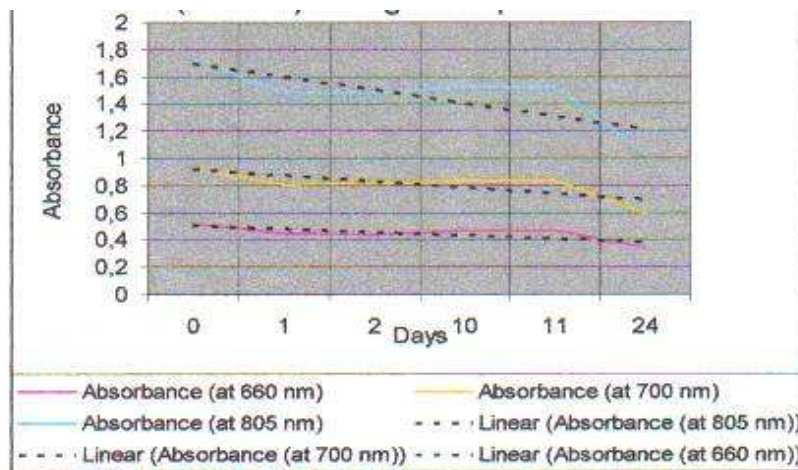


Tabla N° 2 - Absorbancias iniciales y finales obtenidas luego de 24 días a 660 nm

| Concentración de CuSO ₄ /M | Muestra | Valor inicial | Valor final | Diferencia | % de cambio |
|---------------------------------------|---------|---------------|-------------|------------|-------------|
| 0,250 | 2 | 0,873 | 0,679 | 0,194 | 22,22 |
| 0,125 | 3 | 0,515 | 0,331 | 0,184 | 35,73 |
| 6,25 x 10 ⁻² | 5 | 0,246 | 0,162 | 0,084 | 34,15 |
| 3,13 x 10 ⁻² | 8 | 0,159 | 0,093 | 0,066 | 41,51 |

Tabla N° 3 - Absorbancias iniciales y finales obtenidas luego de 24 días a 700 nm

| Concentración de CuSO ₄ /M | Muestra | Valor inicial | Valor final | Diferencia | % de cambio |
|---------------------------------------|---------|---------------|-------------|------------|-------------|
| 0,250 | 2 | 1,743 | 1,312 | 0,431 | 24,73 |
| 0,125 | 4 | 0,930 | 0,660 | 0,270 | 32,26 |
| 6,25 x 10 ⁻² | 5 | 0,428 | 0,255 | 0,173 | 40,92 |
| 3,13 x 10 ⁻² | 8 | 0,264 | 0,115 | 0,149 | 56,44 |

Tabla N° 4 - Absorbancias iniciales y finales obtenidas luego de 24 días a 805 nm

| Concentración de CuSO ₄ /M | Muestra | Valor inicial | Valor final | Diferencia | % de cambio |
|---------------------------------------|---------|---------------|-------------|------------|-------------|
| 0,250 | 1 | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 0,125 | 3 | 1,724 | 1,020 | 0,704 | 40,84 |
| 6,25 x 10 ⁻² | 5 | 0,750 | 0,427 | 0,323 | 43,07 |
| 3,13 x 10 ⁻² | 8 | 0,428 | 0,162 | 0,226 | 62,15 |

Foto N° 2: Efecto de la fitorremediación



En la foto se observa diferencia en la coloración de ambas soluciones.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados presentados en las tablas y la Foto N° 2, luego de 3 semanas se pudo demostrar que las plantas absorben iones de cobre y esto se pudo determinar a partir de un cambio en la coloración del medio de cultivo. Esto indica la concentración de iones cúprico disminuyó según las mediciones de absorbancia que muestran una disminución del valor final respecto del inicial. Es decir que se corroboraron las dos primeras hipótesis. Con respecto a la fitorremediación en sí misma, a partir de estos resultados se puede interpretar que estas plantas podrían contribuir a un proceso de fitorremediación en caso de ser necesario, como plantea la hipótesis N° 3. Teniendo en cuenta que la fitorremediación es un mecanismo empleado para solucionar alteraciones (contaminación) en el ambiente mediante el empleo de plantas, y si suponemos que el Erlenmeyer es un modelo o simulación de medio contaminado, se podría considerar que las plantas “descontaminaron” ese medio, es decir que ocurrió fitorremediación en las muestras del experimento. Se puede observar que el porcentaje de cambio en la absorbancia y por lo tanto en la concentración del ion en solución es más pronunciado cuando las soluciones tienen bajas concentraciones del ion metálico en cuestión pero se observaron muchas fluctuaciones en las lecturas en el colorímetro cuando las concentraciones son muy bajas.

Posibles variaciones

- Medir la concentración de los iones metálicos en solución por titulación redox o de formación de complejos.
- Utilizar distintas variedades de plantas y de iones metálicos.
- Usar diferentes períodos de tiempo.
- Cambiar las concentraciones de iones.

Actividad N° 2. El efecto de la fitorremediación

Objetivo: El objetivo de esta actividad es que el alumno, conociendo la posibilidad de utilizar las plantas para remover sustancias contaminantes, sea capaz de planificar

una experiencia para estudiar el efecto de la fitorremediación sobre diversas variables biológicas.

Se sugiere introducir previamente algunas técnicas de cultivo de plantas, como la construcción de un pequeño invernadero y el cultivo hidropónico, que permitirá el control de variables ambientales y facilitará el posterior diseño de experimentos.

Las habilidades cuyo desarrollo se promueve a partir de esta actividad son:

- Definición de un problema.

- Formulación de hipótesis o suposiciones
- Selección de variables (independiente, dependiente y controladas)
- Elección de material y aparatos a utilizar
- Diseño de un procedimiento que asegure el control de variables y la recolección de datos suficientes y relevantes.

Técnicas de cultivo de plantas

1. Construcción de un pequeño invernadero

Introducción: Los factores que contribuyen a beneficiar a las plantas protegidas bajo invernadero son la difusión y distribución homogénea de la luz y el control de variables como la temperatura y humedad. De esta forma se genera un microclima controlado que favorece la fotosíntesis.

Materiales: caños de PVC, codos, polietileno, pegamento o cinta adhesiva.

Procedimiento: (ver Foto N° 1)

1. Cortar los caños de PVC de la longitud deseada y unir con los codos para formar la estructura.
2. Cubrir externamente con el polietileno y pegar
3. Se recomienda dejar un lateral abierto para tener fácil acceso.
4. Colocar en el exterior donde reciba luz la mayor parte del día

Foto N° 1: Invernadero



2. Preparación de cultivo hidropónico

Introducción: el cultivo hidropónico es aquel en que el suelo es reemplazado por una solución nutritiva donde se encuentran sumergidas las raíces. La solución se mantiene oxigenada mediante el burbujeo de aire.

Las ventajas de este cultivo son: el control de hierbas, de enfermedades y parásitos del suelo, la inexistencia del estrés hídrico, la pequeña cantidad de fertilizantes utilizada se distribuye uniformemente y permite una absorción más homogénea por las raíces y el control completo y estable de nutrientes para todas las plantas

Materiales:

- ✓ Solución de nutrientes KNOP
- ✓ Dos recipientes de plástico
- ✓ Poliestireno (o telgopor)
- ✓ Plántula con raíz
- ✓ Algodón
- ✓ Aireador

Procedimiento: (Ver Foto N° 2)

1. Preparar una solución de nutrientes KNOP (ver Tabla N° 1) y verter hasta llenar las $\frac{3}{4}$

- partes de dos recipientes de plástico (NO translucido)
2. Cortar dos rectángulos de poliestireno expandido de forma y tamaño adecuado para que floten en el recipiente.

Tabla N° 1: Solución de nutrientes KNOP

| Compuesto | Concentración final (g.dm ⁻³) |
|--------------------------------------|--|
| KNO ₃ | 0,2 |
| Ca(NO ₃) | 0,8 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2 |
| FePO ₄ | 0,1 |
| Llevar a pH = 7 | |

3. Realizar orificios (del tamaño requerido según la planta a utilizar) a 3cm de distancia en el rectángulo de poliestireno ya preparado.
4. Seleccionar una plántula con raíz y tallo emergente.
5. Envolver la porción del tallo inmediatamente superior a la raíz con algodón.
6. Colocar las plantas en los orificios realizados asegurándose que las raíces queden sumergidas en el agua.

Foto N° 2: Cultivo hidropónico



7. Colocar un aireador permitiendo que el burbujeo se realice por debajo del poliestireno y mantenga así el agua en movimiento y aireada.
8. Colocar dentro del pequeño invernadero y dejar expuesto a la luz natural (ver Foto N° 3)

Foto N° 3: Cultivo hidropónico dentro del invernadero



Diseño de experimentos de fitorremediación:

Ejemplo N° 1: Comparación de la eficiencia en la remoción del ion cúprico entre tres tipos diferentes de plantas: tomate (*Lycopersicon sp.*), mostaza (*Brassica sp.*) y lechuga (*Lactuca sativa*).

Objetivo: Determinar qué planta es más eficiente en la absorción de cobre presente en soluciones hidropónicas.

Las tres especies de plantas a utilizar tienen la capacidad de acumular cobre. Se considerará como más eficiente aquella especie que se encuentre en la solución que, luego de cierto tiempo, contenga menor cantidad de cobre.

Materiales:

- ✓ Semillas de tomate, mostaza y lechuga
- ✓ Algodón

- ✓ Agua
- ✓ 6 recipientes con solución KNOP
- ✓ solución concentrada de CuSO_4

Procedimiento:

1. Poner a germinar semillas de tomate, mostaza y lechuga. Utilizar algodón húmedo y colocar en un ambiente cálido por 7 días. Durante estos 7 días agregar agua para mantener la humedad.
2. Preparar 6 recipientes para cultivo hidropónico con solución KNOP.
3. Agregar en 3 de los recipientes una solución concentrada de CuSO_4 para lograr una concentración final de CuSO_4 0.025M en cada uno de ellos.
4. Colocar en el primer recipiente una plancha de poliestireno con 10 plántulas de tomate (tomate con CuSO_4). En un segundo recipiente, sin el agregado de CuSO_4 , otra plancha con 10 plántulas de tomate (tomate control).
5. Repetir el paso 4 con las plantas de mostaza y lechuga.
6. Colocar los 6 recipientes dentro de un invernadero.
7. Encender el aireador y dejar expuesto a luz natural.
8. Tomar muestras de la solución cada dos días y medir la concentración de CuSO_4 utilizando un espectrofotómetro o con el método sugerido en la actividad 1.
9. Evaluar la eficiencia en la remoción del ión cúprico (fitorremediación) de cada una de las especies considerando la disminución lograda en la concentración de CuSO_4 por planta /día.
10. ¿Cuál de las especies se consideraría más conveniente para un proceso de fitorremediación?



Una alternativa para este experimento, es obtener muestras del agua que percola de plantas cultivadas en suelo. Para realizar esta variante, en el laboratorio escolar se pueden utilizar botellas plásticas, cortando el tercio superior, invertirlo y colocarlo sobre la base remanente formando cada uno, “una cámara de crecimiento” (ver Foto N° 4).

Procedimiento:

1. Agregar a cada “cámara de crecimiento” un papel de filtro e igual cantidad y calidad de tierra.
2. Colocar 3 plántulas en cada botella.
3. Utilizar 3 botellas para tomate, 3 para mostaza y 3 para lechuga.
4. Como control utilizar una botella con tierra pero sin planta.
5. Dejar que las plántulas crezcan en el suelo por 3 días agregándoles 25 cm³ de agua diariamente.
6. El 4to día agregarles a todas las botellas 25 cm³ de 0.025M CuSO₄
7. El día 8, remover una muestra del filtrado que se encuentra en la base de la botella y medir su contenido de CuSO₄.

8. Comparar lo obtenido en el filtrado de tomate, mostaza y lechuga.

Foto N° 4: Cámara de crecimiento



Otros ejemplos utilizando las mismas técnicas son:

Ejemplo N° 2: Analizar cual estadio del crecimiento del girasol (*Helianthus annuus*) es más eficiente en la absorción del ión cúprico para la realización de la fitorremediación.

Ejemplo N° 3: Estudiar el efecto de la contaminación de ion Cu⁺² sobre el aumento en la masa del brócoli (*Brassica oleracea*)

Ejemplo N° 4: Evaluar los cambios observables en el desarrollo radicular y/o en la coloración de las hojas de *Azolla pinnata* durante el proceso de fitorremediación. (Ver Foto N° 5 y N° 6).

Foto N° 5: Desarrollo radicular



Foto N° 6: Coloración de las hojas



Material de consulta

- *Rutas a tecnologías para la investigación y limpieza de terrenos contaminados.* Bernal, M. P. 1997. Apuntes. Departamento de Conservación del Suelos y Aguas y Manejo de Residuos Orgánicos de Edafología y Biología Aplicada del Segura. Consejo Superior de Investigación Científica. (CSIC). Murcia, España.
- Leep, N.W., *Effect of Heavy metal Pollution on Plants*, volume I: Effects of trace metals on plant functions. London, Applied Science Publishers, 1981
- Grupo de Ingeniería Ecológica. (sitio en inglés) <http://www.ecological-engineering.com/phytorem.html>
- Rutas a tecnologías para la investigación y limpieza de terrenos contaminados
- http://www.epa.gov/superfund/action/spanish/pdfs/esp_roadmap.pdf Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. Oficina de Desechos Sólidos www.epa.gov/TIO
- Biorremediación. Cuaderno N° 36. programa Por Qué Biotecnología. http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_36.asp?cuaderno=36