

## Comparative assessment of *Lemna obscura* growth with organic and inorganic nitrogen sources as a function of pH

Charity E. Andrade R.<sup>1</sup>, Nerva M. Morales<sup>2</sup>, Alexandra L. Vera B.<sup>1</sup>, Lorena Jonte<sup>1</sup>, Beltrán Briceño<sup>1</sup>, Néstor L. Rosales L.<sup>1</sup>, Ever D. Morales A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Apartado Postal 526. Maracaibo 4001-A, Venezuela.

<sup>2</sup>Instituto para el Control y Conservación de la Cuenca del Lago de Maracaibo (ICLAM). Maracaibo, Venezuela.

Tel: (0414) 6338004, (0414) 0635794. \* evermster@gmail.com

### Abstract

Discharges of untreated wastewater to water bodies, make them suitable culture media for the overgrowth of floating aquatic plants causing environmental and health problems. Growth of *Lemna obscura* from the Lake of Maracaibo, Venezuela, in function of the nitrogen sources (NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>, CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) at 1 mM and pH (3.5, 4, 5, 6, 7 and 9) was evaluated. Also, the effect of urea (0.1, 1, 5 y 10 mM) at pH 5 was assessed. *L. obscura* grew between pH of 4-9 in all nitrogen sources. However, at pH 3.5 there was a lethal effect during the first 15 days. The highest growth was achieved at pH 5, and the highest values with urea (1839,67±75,45 fronds). In presence of urea as the best nitrogen source, maximum growth was achieved (2923,00±130,8 fronds) at 1 mM. The effective growth of *L. obscura* with all nitrogen sources and in a wide range of pH demonstrated the high reproductive capacity and adaptability of this macrophyte, distinguishing their ability to become an aquatic weed in eutrophic water bodies.

**Keywords:** *Lemna*, growth, Lake of Maracaibo, nitrogen sources, pH.

## Estudio comparativo del crecimiento de *Lemna obscura* con fuentes nitrogenadas de origen orgánico e inorgánico en función del pH

### Resumen

Las descargas de aguas residuales sin tratamiento a los cuerpos de agua, los convierten en medios de cultivo apropiado para el crecimiento excesivo de plantas acuáticas flotantes ocasionando problemas ambientales y de salud. El crecimiento de *Lemna obscura* del lago de Maracaibo, Venezuela, se evaluó en función de las fuentes nitrogenadas (NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>, CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) a 1 mM, cada una a pH (3,5; 4; 5; 6; 7 y 9). Así mismo, se evaluó el efecto de la urea a las concentraciones de 0,1; 1; 5 y 10 mM a pH 5. *L. obscura* creció a pH entre 4-9 en todas las fuentes nitrogenadas. Sin embargo, a pH 3,5 se produjo un efecto letal durante los 15 primeros días. El mejor crecimiento de la planta se alcanzó a pH 5, reportándose el máximo valor con urea (1839,67±75,45 frondes). En presencia de urea como la mejor fuente nitrogenada, se obtuvo el máximo crecimiento (2923,00±130,8 frondes) a 1 mM. El efectivo crecimiento de *L. obscura* con todas las fuentes nitrogenadas y en una amplia escala de pH demostró la alta capacidad de reproducción y adaptabilidad de esta macrófita, distinguiendo su capacidad de convertirse en una maleza acuática en cuerpos de agua eutrofizados.

**Palabras clave:** *Lemna*, crecimiento, Lago de Maracaibo, fuentes nitrogenadas, pH.

## Introducción

La familia *Lemnaceae* agrupa a plantas acuáticas diminutas, de libre flotación, con poco florecimiento, pertenecientes al grupo de las angiospermas monocotiledóneas [1]. La *Lemna* o lenteja de agua se propaga comúnmente de forma vegetativa en aguas tropicales y es considerada como indicadora de eutrofización en cuerpos de agua, debido a que su presencia está asociada a áreas con aleatoriedad de condiciones ambientales causadas por el alto grado de acción antrópica, como descargas de aguas residuales y remoción de sedimentos por actividad minera, por lo cual, en algunas ocasiones han sido utilizadas para el tratamiento de aguas residuales [2-5]. En el Lago de Maracaibo, Venezuela durante el año 2004, se experimentó un crecimiento excesivo de la planta acuática identificada como *Lemna obscura* [6]. Este crecimiento que fue asociado entre otros factores, con el aumento en la concentración de nutrientes (nitrógeno y fósforo), con motivo de las continuas descargas de aguas residuales parcialmente tratadas o sin ningún tipo de tratamiento que se vierten en él; a pesar del continuo trabajo de vigilancia y pronóstico de *Lemna* en el Lago de Maracaibo realizado por el Instituto para el Control y Conservación del lago de Maracaibo y el Centro de Modelado Científico (CMC) de Universidad del Zulia, donde se ha corroborado el ciclo cuasi-anual para esta planta [7], es necesaria la realización de estudios sobre las condiciones que pueden propiciar el crecimiento excesivo de esta macrófita. Entre los factores principales involucrados en su reproducción, se encuentran las fuentes nitrogenadas (inorgánicas y orgánicas), el fósforo, y el pH del medio. Este último es un factor importante en cualquier proceso biológico, ya que la solubilidad del fósforo, hierro, zinc, manganeso, y por lo tanto, su disponibilidad en el agua, está subordinada a este parámetro. El estudio del efecto de fuentes nitrogenadas y del pH en *L. obscura* obtenida del Lago de Maracaibo, nos puede indicar la capacidad de reproducción y alta competencia en aguas eutrofizadas a diferentes pH.

## Parte experimental

Se realizaron cultivos de la planta *L. obscura* colectada del Lago de Maracaibo, específicamente

en la Vereda del Lago, Maracaibo-Venezuela. Para los cultivos se utilizaron frascos de vidrio de 500 mL de capacidad conteniendo 350 mL de agua del Lago de Maracaibo, previamente esterilizada por autoclave y enriquecida con medio de cultivo comercial ALGAL [8] sin nitrógeno (oligoelementos y fosfato 0,02 mM). El control se realizó con este medio de cultivo y agua potable a una concentración equivalente a 2 mM  $\text{NaNO}_3$ . En la primera fase se determinó la influencia del pH sobre el crecimiento de *L. obscura* en función de la fuente nitrogenada. Las fuentes nitrogenadas urea ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ), nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) y cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), fueron adicionadas al medio de cultivo a una concentración de 1 mM. La salinidad del agua del lago utilizada fue 4 ppt.

Los bioensayos se iniciaron con 20 colonias de *Lemna* correspondientes a  $70,0 \pm 8,2$ ;  $51,6 \pm 3,1$ ;  $39,8 \pm 0,7$  y  $62,5 \pm 5,5$  frondes iniciales para las fuentes nitrogenadas  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ , urea y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  respectivamente, las cuales presentaron un promedio de clorofila total de  $1,050 \pm 0,037 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

Los cultivos con cada una de las fuentes nitrogenadas se realizaron por cuadruplicado a pH 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 y 9,0 los cuales fueron ajustados diariamente con NaOH o HCl 1N. Todos los bioensayos se mantuvieron a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperiodo 12:12h, una irradiancia de  $86 \mu\text{mol q m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y sin aireación durante 20 días.

En la segunda fase se evaluó la variación del contenido de nutrientes en el crecimiento y contenido de clorofila de *L. obscura*. Para ello se seleccionó la fuente nitrogenada y el pH que produjo el mayor crecimiento de la planta. La fuente nitrogenada urea, en este caso fue adicionada al medio a concentraciones iniciales de 0; 0,1; 1; 5 y 10 mM, una concentración de oligoelementos y fosfato de 0,1 mM, y se realizó el ajuste de pH a 5. Los cultivos, por cuadruplicados, se iniciaron con 10 colonias de *Lemna* y un promedio de  $21,95 \pm 1,33$  frondes, ajustándose diariamente a pH 5 bajo las mismas condiciones ambientales establecidas para los cultivos anteriores. El crecimiento fue seguido mediante recuento de colonias y frondes cada cinco días hasta los 50 días de iniciados los cultivos; mientras que, el contenido de pigmentos se cuantificó durante la fase estacionaria del experimento.

### Determinación del crecimiento y contenido de clorofila

El crecimiento de *Lemna* se siguió cada 5 días, por conteo del número de frondes verdes. La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) fue determinada según la ecuación:

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1),$$

donde:  $X_1$  y  $X_2$  corresponden al número de frondes viables determinados en los tiempos  $t_2$  y  $t_1$ .

El tiempo requerido para duplicar el número de frondes ( $td$ ) fue calculado con relación a la ecuación:

$$td = (\ln 2) / \mu.$$

El contenido de clorofila total se determinó al finalizar el ensayo (fase estacionaria) mediante extracción con acetona:metanol (2:1) utilizando las ecuaciones propuestas por Wellburn [9].

### Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron comparados mediante un análisis de varianza factorial  $3 \times 7$ , con Tuckey como prueba PocHot, para comparar medias a un nivel de significancia del 95%, mediante el programa estadístico para Windows SPSS versión 11,0.

## Resultados

### Cloruro de amonio como fuente nitrogenada

El efecto del uso de cloruro de amonio a diferentes valores de pH se muestra en la Figura 1, donde se distingue para pH 4, 5, 6, 7 y 9 una fase de adaptación de 5 días, a partir de los cuales se inició una fase de crecimiento exponencial con la mayor rapidez de duplicación a pH 5 (0,194 fronde.d<sup>-1</sup>) (Tabla 1) y menor rapidez a pH 9 (0,086 fronde.d<sup>-1</sup>). Para estos casos el tiempo de duplicación fue de 3,57 y 8,06 días, respectivamente.

El mayor crecimiento para esta fuente nitrogenada se dio a pH 5 donde alcanzó los  $1384 \pm 133$  frondes (Tabla 1), logrando superar 19,77 veces el inóculo inicial ( $F_m/F_i$ ); este tratamiento obtuvo diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al resto de los ensayos, conserván-

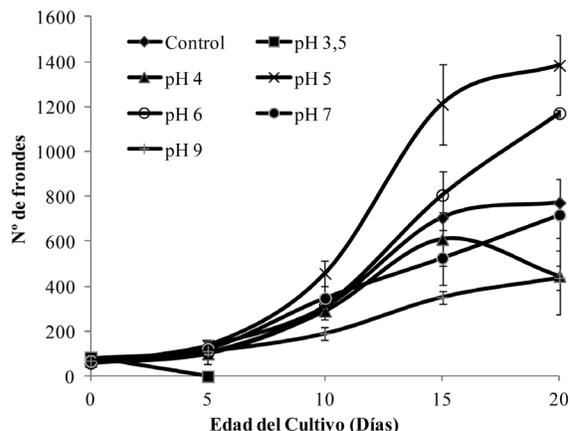


Figura 1. Crecimiento de *L. obscura* utilizando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en función del pH.

dose el orden:  $\text{pH } 5 > 6 > \text{control} \geq 7 > 4 \geq 9$ . El pH 3,5 reportó muerte total del cultivo hacia el día 5 de cultivo.

El contenido de pigmentos, fue estimulado para casi todos los pH con respecto al valor inicial, a excepción del tratamiento a pH 9 donde se obtuvo una disminución del 58% en este pigmento (de  $1,05 \pm 0,04$  hasta  $0,44 \pm 0,03 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) (Tabla 2). La máxima producción de clorofila se logró a pH 6 con  $5,26 \pm 0,15 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ , este valor mantuvo diferencia significativa con el resto de los tratamientos.

### Nitrato de sodio como fuente nitrogenada

Al utilizar nitrato de sodio como fuente nitrogenada (Figura 2) la fase de adaptación fue mayor a la reportada para  $\text{NH}_4\text{Cl}$  con una duración de 10 días.

El crecimiento hacia los 20 días estuvo liderado por el tratamiento a pH 5 el cual logró una reproducción de  $1639 \pm 188$  frondes, con lo que superó 31,75 veces ( $F_m/F_i$ ) su población inicial (Tabla 1), sin mostrar diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) con el tratamiento a pH 6 ( $1548 \pm 223,8$  frondes), el cual superó 30 veces su valor inicial, pero si con el resto de los tratamientos ( $p < 0,05$ ). Los tratamientos a pH 5 y 6 obtuvieron las mayores velocidades de reproducción con 0,258 y 0,243 fronde.d<sup>-1</sup>, respectivamente. El orden general de crecimiento reportado para esta fuente nitrogenada fue:  $\text{pH } 5 \geq 6 > 7 \geq 4 > \text{control} > 9$ . El tra-

Tabla 1  
Velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), Tiempo de duplicación (td) y Crecimiento (Fm/Fi)

pH	NaNO <sub>3</sub>			NH <sub>4</sub> Cl			NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>			Urea		
	$\mu$ (F.d <sup>-1</sup> )	T <sub>d</sub> (d)	F <sub>m</sub> /F <sub>i</sub>	$\mu$ (F.d <sup>-1</sup> )	T <sub>d</sub> (d)	F <sub>m</sub>	$\mu$ (F.d <sup>-1</sup> )	T <sub>d</sub> (d)	F <sub>m</sub>	$\mu$ (F.d <sup>-1</sup> )	T <sub>d</sub> (d)	F <sub>m</sub> /F <sub>i</sub>
4	0,216	3,21	1153,5	0,148	4,68	610,3	0,203	3,54	1028	0,183	3,80	26,83
5	0,258	2,68	1639,0	0,194	3,57	1384,0	0,259	2,68	1392,5	0,194	3,62	45,99
6	0,243	2,86	1548,3	0,187	3,71	1171,0	0,256	2,86	1506,25	0,189	3,67	30,44
7	0,226	3,06	1259,0	0,102	6,80	526,7	0,244	2,91	1025,23	0,186	3,75	37,73
9	0,180	3,86	592,5	0,086	8,06	437,5	0,147	6,53	80,67	0,174	4,10	24,61

F: n° frondes iniciales, Fi: n° frondes máximos alcanzados.

Tabla 2  
Contenido de Clorofila Total ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )

pH	NaNO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Urea
Inicio	1,05±0,04	1,05±0,04	1,05±0,04	1,05±0,04
4	1,00±0,04	2,05±0,21	7,74±0,70	4,79±0,72
5	1,04±0,30	1,64±0,05	7,94±0,49	4,03±0,41
6	0,86±0,11	5,26±0,15	2,24±0,27	4,62±0,73
7	0,89±0,21	3,66±0,44	1,93±0,31	4,35±1,50
9	0,48±0,03	0,44±0,03	ND	4,15±0,57

ND: no se pudo determinar poca muestra.

tamiento a pH 3,5 no mostró crecimiento, por el contrario hubo un descenso progresivo en su número, reportando la muerte total hacia el día 15 de cultivo.

El contenido de clorofila no fue estimulado con esta fuente nitrogenada (Tabla 2), este contenido se mantuvo para los tratamientos a pH 4 y 5, con  $1,00 \pm 0,04$  y  $1,04 \pm 0,30 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  respectivamente, mientras que, para el resto de los tratamientos se reportó una disminución en el orden siguiente:  $\text{pH} 9 < 7 \leq 6$  las cuales reportaron valores de  $0,48 \pm 0,03$ ;  $0,86 \pm 0,11$  y  $0,89 \pm 0,21 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  respectivamente.

### Nitrato de amonio como fuente nitrogenada

Al utilizar nitrato de amonio (Figura 3) la fase de crecimiento exponencial se inició al igual que con  $\text{NaNO}_3$  a partir del día 10, logrando para el día 20 el mayor crecimiento en el tratamiento a pH 5 con  $1813 \pm 127,3$  frondes, duplicando 29,01 veces su valor inicial (Tabla 1). Este valor fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) al reportado para el resto de los tratamientos los cuales siguieron el orden:  $\text{pH} 5 > 6 > 4 > 7 = \text{control} > 9$ . De igual forma, a pH 5 se reportó la mayor velocidad de crecimiento ( $0,259$  fronde  $\cdot \text{d}^{-1}$ ) y menor tiempo de duplicación 2,68 días. El tratamiento a pH 3,5 experimentó su muerte total hacia el día 5, por otro lado, el tratamiento a pH 9 reportó muerte total del cultivo para el día 15.

Esta fuente nitrogenada estimuló la producción de pigmentos bajo todos los pH (Tabla 2), alcanzando un máximo de  $7,94 \pm 0,49 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  a pH 5, seguido estrechamente por el tratamiento a pH 4 con  $7,74 \pm 0,70 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ , el resto de los tratamientos se encontraron por debajo de  $2,24 \pm 0,27 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

### Urea como fuente nitrogenada

*Lemna obscura* utilizando urea como fuente nitrogenada, mostró un crecimiento exponencial desde el día 5 (Figura 4), logrando al igual que para el resto de las fuentes nitrogenadas evaluadas su mayor crecimiento a pH 5 con 1830,4 frondes, superando su número inicial 45,99 veces (Tabla 1), mostrando diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al resto de los tratamientos, este tratamiento obtuvo la mayor velocidad

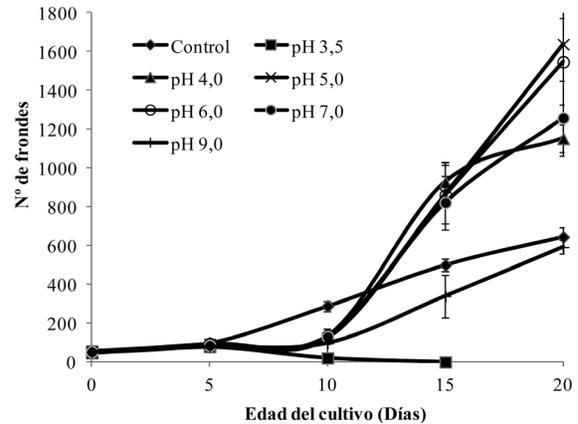


Figura 2. Crecimiento de *Lemna obscura* utilizando  $\text{NaNO}_3$  en función del pH.

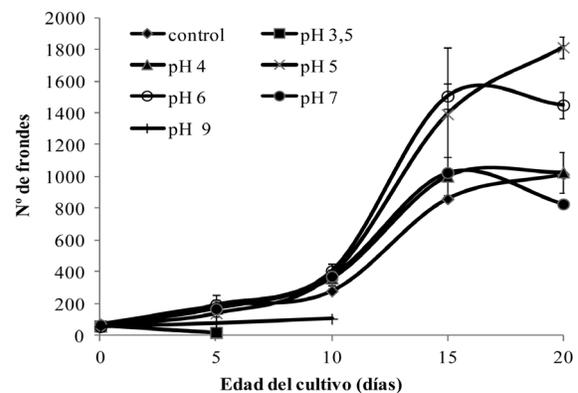


Figura 3. Crecimiento de *Lemna obscura* utilizando  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en función del pH.

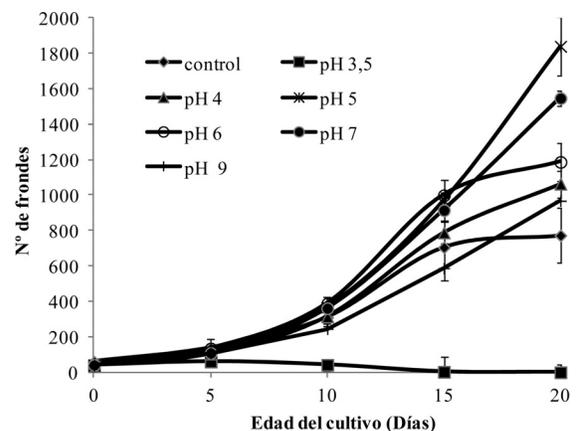


Figura 4. Crecimiento de *Lemna obscura* utilizando Urea en función del pH.

de crecimiento con  $0,194 \text{ fronde} \cdot \text{d}^{-1}$  y el menor tiempo de duplicación 3,62 días, el crecimiento con urea siguió el siguiente orden de pH:  $5 > 7 > 6 > 4 > 9$ . Asimismo, a pH 3,5 se reportó efecto letal de los cultivos a partir del día 15 del experimento.

La urea al igual que el  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  reportó estimulación en la producción de pigmentos a todos los pH evaluados alcanzando un máximo para pH 4 con  $4,79 \pm 0,72 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  y manteniendo el resto de los tratamientos valores cercanos a  $4 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  (Tabla 2).

Al realizar la comparación de todas las fuentes nitrogenadas podemos destacar que la mayor reproducción de la planta *Lemna obscura* se obtuvo utilizando urea como fuente nitrogenada, (1830 frondes), seguida de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1813 frondes),  $\text{NaNO}_3$  (1639 frondes) y por último  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1384 frondes), este crecimiento se reportó para todos los casos a pH 5. A pesar de haber alcanzado el mayor crecimiento con urea, la mayor velocidad de crecimiento y menor tiempo de duplicación se alcanzó con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  con  $0,259 \text{ fronde} \cdot \text{d}^{-1}$  y 2,68 días, respectivamente, para pH 5.

Con respecto al contenido de pigmentos, para las fuentes nitrogenadas  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , Urea y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se obtuvo una estimulación en cuanto a la producción de estos metabolitos con respecto al valor inicial, sin embargo, para las fuentes nitrogenadas  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 9) se reportaron disminuciones en éste. El  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  reportó el mayor contenido de clorofila con  $7,94 \pm 0,49 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ , superando el valor del inóculo en 7,56 veces (Fm/Fi).

Al ser la urea la fuente nitrogenada usada más eficientemente por la planta *Lemna*, se eva-

luó el crecimiento de la planta a diferentes concentraciones, manteniendo el pH del medio en 5, durante 50 días (Figura 5).

La fase de crecimiento exponencial se inició a los 5 días para todos los tratamientos, extendiéndose en algunos casos (concentración 1 y 10 mM) hasta los 50 días de cultivo. Se observó un crecimiento acelerado para el tratamiento con concentración de 1mM, el cual marcó diferencia significativa con respecto al resto ( $p < 0,05$ ), reportando un número de frondes de  $2923,5 \pm 130,8$  a los 50 días, lo que significó un aumento de 133,2 veces su cantidad inicial ( $21,95 \pm 1,33$  frondes). Al compararse con el resto de los tratamientos la concentración de 1mM duplicó 1,88; 2,63; 11,0 y 24,2 veces el crecimiento alcanzado por las concentraciones de 10, 5, 0,1 y 0 mM, respectivamente (Tabla 3).

Es importante resaltar que concentraciones superiores a 1mM (5 y 10 mM) produjeron un

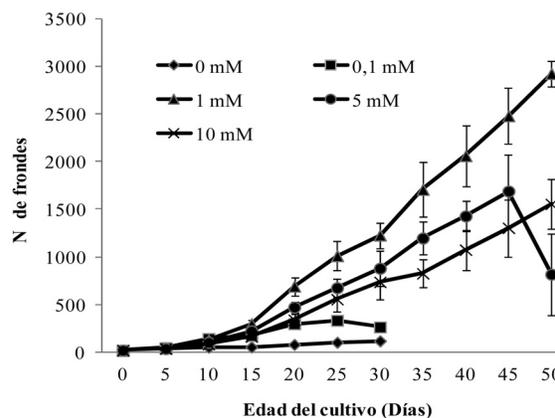


Figura 5. Crecimiento de *Lemna obscura* en función de la concentración de Urea.

Tabla 3  
Crecimiento máximo y Clorofila Total en función de la concentración de Urea a pH 5

Concentración (mM)	Crecimiento máximo (N° frondes)	Clorofila Total ( $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ )
0	$120,8 \pm 9,8^*$	$0,94 \pm 0,07$
0,1	$266,8 \pm 46,3^*$	$1,54 \pm 0,16$
1,0	$2923,5 \pm 130,8$	$2,13 \pm 0,03$
5,0	$1112,0 \pm 428,5$	$2,83 \pm 0,30$
10,0	$1555,5 \pm 258,4$	$2,14 \pm 0,34$

\*Valor a los 30 días, el resto de los valores se determinaron a los 50 días.

efecto inhibitorio en un 32% y 48%, respectivamente, con respecto al óptimo. Sin embargo, el crecimiento a estas dos concentraciones superó 5 y 4,6 veces, los cultivos iniciados con 0,1 mM. En general, se obtuvo el siguiente orden de crecimiento:  $1 > 5 > 10 > 0,1 > 0$  mM. Concentraciones menores o iguales a 0,1 mM alcanzaron su fase estacionaria hacia el día 30.

El contenido de clorofila total mantuvo una relación directamente proporcional con la concentración de urea en el medio hasta los 5 mM (Tabla 3), reportando las menores cantidades para 0 mM ( $0,94 \pm 0,07 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) y las mayores para 5 mM ( $2,83 \pm 0,30 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), por encima de esta concentración (10 mM) el contenido de clorofila reportó un ligero descenso con respecto a la concentración de 5 mM.

## Discusión de resultados

### Influencia del pH en el crecimiento de *L. obscura*

La influencia del pH en la absorción de nutrientes de las plantas acuáticas es complejo, especialmente debido a que la solubilidad del fosfato y algunos elementos trazas (Fe, Mo, Zn y Mn) pueden cambiar con la variación de pH. Sin embargo, se ha demostrado la posibilidad de crecimiento de 15 especies de Lemnaceas entre pH 5 y 8 sin experimentar reducción significativa de la velocidad de crecimiento [10].

En este estudio, *L. obscura* reportó crecimiento en medios de cultivo con pH en el rango entre 4 y 9, con un crecimiento óptimo a pH entre 5 y 6. De manera similar se ha descrito un amplio rango de crecimiento para la especie *Lemna minor* en condiciones naturales [11], y con valores de pH entre 6 y 9 en aguas residuales [12, 13]. Rook [14] por su parte indicó, un rango de pH óptimo entre 4,5 y 7,5. Mientras que, Maclay [15] al estudiar tres especies de lenteja de agua *Spirodela oligorrhiza*, *Lemna minor* y *Wolffia arrhiza*, observó que éstas tienen un pH óptimo cercano a 7. Para la *Spirodela* el pH óptimo fue de 7,0 con rangos de tolerancia inferior y superior a 3 y 10 respectivamente.

A pH entre 5 y 6 los nutrientes requeridos por la planta se encontraron más fácilmente disponibles, lo que se verificó por la rápida duplica-

ción de la planta a estos pH para todas las fuentes nitrogenadas evaluadas (velocidad entre 0,086 y 0,259 frond. $\cdot$ d $^{-1}$ ) y el tiempo de duplicación (de 2 a 8 días) demostrando la alta capacidad de reproducción en casi cualquier tipo de medio por lo cual es causante de los múltiples problemas en las aguas naturales, como los presentados en el Lago de Maracaibo en 2004 donde el elevado crecimiento de biomasa logró cubrir hasta cerca del 20% del espejo lacustre [16].

Por su parte, desde el punto de vista químico, pH elevados pueden ocasionar la precipitación de sales de fosfato, hierro, manganeso, zinc y cobre, con lo cual hace menos disponibles estos nutrientes para el crecimiento de la planta [17]. El crecimiento de *Lemna* a pH altos ha sido poco estudiado [10]. En el presente estudio a pH elevado (pH 9), se observó crecimiento de microalgas (diatomeas, clorofitas, filamentosas) y cianobacterias en las raíces y frondes de las plantas formando aglomerados gelatinosos que conllevaron a la muerte temprana de esos cultivos. De igual forma, Morales y colaboradores [18], reportaron un efecto nocivo a pH 9 lo cual provocó la muerte total del cultivo por crecimiento excesivo de cianobacterias (pH óptimo > 9). Problemas de competencia entre microalgas y la planta *Lemna* sp. fueron reportados por Núñez y colaboradores [19] quienes indican que el crecimiento y la competencia no permitieron el desarrollo de la planta acuática *Lemna* sp. en la forma esperada, en humedales construidos cultivados (agua residual más material de soporte más la planta flotante) lo que ocasionó que el tratamiento alcanzara los menores porcentajes de remoción para nitrógeno total y nitrógeno amoniacal, mostrando incremento en el caso del N-NO<sub>2</sub>.

Por otra parte, un pH ácido de 3,5 ocasionó un efecto letal en los cultivos, provocando la muerte del 100% de las plantas en un periodo menor a 15 días, lo que se relaciona directamente con el hecho de que la *Lemna* presenta sensibilidad al efecto de hongos fitopatógenos que invaden la planta a pH < 6 [17].

### Influencia de las fuentes nitrogenadas en el crecimiento de *L. obscura*

La planta acuática *Lemna obscura* demostró crecimiento en todas las fuentes nitrogenadas

utilizadas, reportando las mayores velocidades de crecimiento en los medios con nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) como fuente nitrogenada ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{NaNO}_3$ ). Muchas plantas terrestres, arvejas y tomates, por ejemplo, crecen mejor bajo la presencia de fuentes inorgánicas como nitratos y amonio; debido a esto, muchos botánicos suponen que, de forma similar, las plantas acuáticas absorben y crecen mejor en presencia de estas fuentes [20]. Por su parte, Oron y col. [21] observaron que la lenteja de agua muestra preferencia en la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  sobre el nitrato  $\text{NO}_3^-$ . Esta asimilación preferencial está asociada a la disminución de requerimientos de energía para la asimilación de  $\text{NO}_3^-$ . Sin embargo, la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  es sensible a la temperatura y ocurre solamente en el rango de pH de 6 a 8. De igual forma Closte y Suni [22], evidencian que *L. gibba* asimila de mejor manera el nitrógeno en la forma  $\text{NH}_4^+$  que el  $\text{NO}_3^-$  del medio de cultivo en proporciones similares o mayores al  $\text{NH}_4^+$  favorece el rendimiento del peso fresco y peso seco.

Al evaluar el crecimiento de *Lemna obscura* en diferentes zonas del Lago de Maracaibo, Barboza y col. [6] observaron tasas de crecimiento exponencial entre 0,0838 y 0,2264 fronde. $\text{d}^{-1}$  y tiempos de duplicación entre 3,06 y 7,27 días, la mayor tasa de crecimiento se reportó en la Laguna El Imazo donde las aguas son tranquilas (sin oleaje), con poca profundidad y elevada concentración de nitratos y fósforo.

*Lemna* capta este nitrógeno inorgánico a través de las frondes y las raíces, logrando aclimatarse morfológica y fisiológicamente a la disponibilidad de nitrógeno en el medio, exhibiendo una mayor longitud de raíz en los medios con menor disponibilidad de este nutriente.

A pesar de haber obtenido la mayor velocidad de crecimiento con nitratos como fuente nitrogenada, el máximo crecimiento fue alcanzado con urea; conociendo que dentro del proceso de descomposición anaeróbica por hidrólisis microbiana, el nitrógeno de los compuestos orgánicos es convertido en nitrógeno amoniacal, se sugiere la presencia activa de la enzima ureasa dependiente del pH y cuya actividad hace accesible dos moléculas de  $\text{NH}_4^+$  para ser incorporadas directamente al metabolismo a través de la glutamina sintetasa [23, 24]. El crecimiento óptimo con urea se reportó a la concentración de 1mM a pH

5, por debajo o por encima de ésta ocasionaron un descenso en el crecimiento de esta planta. Estudios anteriores han demostrado de igual forma el mayor crecimiento de esta macrofita con urea a 1 mM y pH 4 en comparación con otras fuentes nitrogenadas inorgánicas [18].

Espejo y col. [25] por su parte, al estudiar el crecimiento de *Lemna minor* en microlagunas demostraron que esta planta aumenta la producción de biomasa al suministrar fertilizante orgánico, siendo capaz de duplicar su biomasa en 7 días con el peso de material vegetativo máximo (30 g de la planta), mientras que para una cantidad menor (5 g de la planta) el crecimiento es más acelerado, debido a la mayor superficie de espejo de agua y a que la cantidad de nutrientes es proporcionalmente mayor.

Estudios anteriores con *Lemna minor*, han determinado que la misma es capaz de remover en un periodo de operación de 14 días, el 7% del nitrógeno y el 10% del fósforo presente en el medio [26]. Walstad [12] ha comprobado que *Lemna gibba*, por su parte, elimina el 50% del amonio, de una solución con nutrientes, en un lapso de 5 horas aun cuando la concentración de nitratos supere en más de 100 veces la concentración de amonio; *Lemna aequinoctiales* ha demostrado ser igualmente eficiente para reducir considerablemente la carga de nutrientes del residual vacuno logrando satisfacer los estándares recomendados para aguas residuales [27].

En cuanto al contenido de clorofila de *Lemna obscura*, se evidenció que éste estuvo influenciado tanto por la fuente nitrogenada utilizada como por el pH del medio, alcanzándose la máxima producción al utilizar como fuente de nitrógeno el amonio. Es decir, con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y para valores de pH entre 4 y 6. En urea, el contenido de este pigmento fue menor que los obtenidos en los tratamientos que usaron amonio, alcanzando sus máximos valores en la concentración de 5 mM.

## Conclusiones

La planta acuática *L. obscura* es capaz de crecer utilizando como fuente nitrogenada  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ , Urea o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , y en un rango de pH entre 4 y 9. Estableciéndose un pH de 5 como el óptimo de crecimiento. El crecimiento óptimo con urea se reportó a la concentración de 1mM a

pH 5; valores inferiores o superiores a esta concentración inducen una disminución en la producción de frondes. Luego de la Urea se obtuvo un mejor crecimiento utilizando  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y por último  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . El contenido de clorofila se estimuló en el rango de pH entre 4 y 6, al utilizar  $\text{NH}_4$  como fuente de nitrógeno, es decir, se mantuvo en el orden:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a pH 5 >  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a pH 6 > Urea a pH 4 >  $\text{NaNO}_3$  a pH 5.

### Agradecimientos

El presente trabajo de investigación ha sido cofinanciado por el Proyecto ICLAM P0402-5.

### Referencias bibliográficas

1. Barboza, F. "Estudio e identificación de las plantas acuáticas presentes en la Laguna de Sinamaica". Instituto para el Control y Conservación de la Cuenca del Lago de Maracaibo C-91-11-077-O. Maracaibo, Zulia, 1991.
2. Palma B. "Distribución espacial de la flora y vegetación acuática y palustre del estero de Marga- Marga en Chile Central". Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Chile, 1986.
3. Driever S., Van Nes E. y Roijackers R. "Grow-limitation of *Lemna minor* due to high plant density". Aquatic Botany Vol.81, N°3 (2005) 245-251.
4. Celis J., Junod J. Y Sandoval M. "Recientes aplicaciones de la depuración de aguas residuales con plantas acuáticas". Vol. 14, N° 1 (2005) 17-25.
5. Qiu D., Wu Z., Liu B. Deng J. Fu G. Y He F. "The restoration of aquatic macrophytes for improving water quality in a hypertrophic shallow lake in Hubei Province, China". Ecol Eng Vol. 18, N° 2 (2001) 147-156.
6. Barboza, F., Herrera, L., Sánchez J., Morillo G. y Trujillo A. Crecimiento de *Lemna obscura* en el sistema del Lago de Maracaibo. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. Vol.42 N°1 (2008). 93-100.
7. Monitoreo de la cobertura de *Lemna* en el lago de Maracaibo, Venezuela por sistema satelital y software. 2011. (CAVEL, o Código Abierto Venezolano de Evolución de *Lemna*) <http://www.cmc.org.ve/ole2/MODELOS/CAVEL/LGM/SDT.gif>
8. Fábregas, J.; Abalde, J. Y Herrero, C. "Biochemical Composition and Growth of the Marine Microalgae *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different Ammonium Nitrogen Concentration as Chloride, Sulphate, Nitrate and Carbonate". Acuaculture. Vol.83 (1989) 289-304.
9. Wellburn, A.R. "The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as Well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution". J. Plant. Physiol. Vol. 144 (1994)307-13.
10. Landolt, E. y Kandeler, R. "Biosystematics investigation in the family of duckweeds (Lemnaceae). The family of the Lemnaceae: a monographic study". Vol. 2. Veroff. Geobot. Inst. ETH, Zurich. 1987.
11. Arroyave M. "La lenteja de agua (*Lemna minor*): una planta acuática promisoría". Escuela de Ingeniería de Antioquia, Ingeniería Forestal. Medellín (Colombia). 2004.
12. Körner, S., Das S., Vermaat J. y Veenstra S. "The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*". Aquatic Botany. Vol.71 (2001) 71-78.
13. Zimmo, O., Al Saled R. y Gijzen H. "Comparison between algae-based and duckweed-based wastewater treatment: differences in environmental conditions and nitrogen transformations". Water Sc. Tech. Vol.42 (2000) 215-222.
14. Rook, E. 2002. "Flora, fauna, earth and sky. The natural history of the northwoods". De:www.rook.org/earl/bwca/nature/aquatics/lemna.html
15. Maclay C. "The effect of pH on the population growth of three species of duckweed: *Spirodela oligorrhiza*, *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza*". Freshwater Biology. Vol. 6, (1976) 125-136.
16. Herrera, L., H. Severeyn, J. Rincón, E. Morales, G. Morillo, F. Barboza, I. Araujo, C. Cárdenas, O. Zambrano, G. Godoy, S. Yabroidi, A. Ferrer y Y. García. 2004. Informe del afloramiento masivo de *Lemna* sp. en el Lago de Maracaibo. Comisión Especial designada por

- el Consejo Universitario de La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, 8 pp.
17. Szabó, S., Roijackers R. y Scheffer M. "A simple method for analysing the effects of algae on the growth of *Lemna* and reventing algal growth in duckweed bioassays". Archiv Für Hydrobiologie. Vol.157 (2004) 567-575.
  18. Morales N., Arévalo K., Ortega J., Briceño B., Andrade C. y Morales E. "El pH y la fuente nitrogenada como moduladores del crecimiento de la macrófita *Lemna* sp". Revista de la Facultad de Agronomía. Vol. 23, N°1 (2006) 70-83.
  19. Núñez M., Cárdenas C., Ramírez Y., Rincón S., Saules L., Morales E. "Remoción de nitrógeno en aguas residuales a través de las plantas *Typha dominguensis* y *Lemna* sp." Revista AIDIS, Vol. 1, No. 2, (2007)
  20. Walstad D. "Ecology of the planted aquarium". Planta acuáticas y filtración biológicas. Echinodorus publishing. (2003)
  21. Oron, G., Porath, D. y Wildschut, L. "Wastewater treatment and renovation by different duckweed species". Journal Environmental Enginnering. ASCE.Vol.112, N°2 (1986)247-263.
  22. Clostre G. y Suni M. "Efecto del nitrógeno, fósforo y potasio del medio de cultivo en el rendimiento y valor nutritivo de *Lemna gibba* (Lemnaceae)". Rev. Peruana de Biología. Vol 13, N° 3 (2007) 231-235.
  23. García O. y Caicedo J. "Efectos del amonio y del pH sobre el crecimiento de *Spirodela polyrrhiza* cultivado en efluentes de reactores UASB. Rev. Bol. Ecol. 8: 17-23, 2000. 17-23.
  24. Joy K. "Nitrogen metabolism of *Lemna minor*. II. Enzymes of nitrate assimilation and some aspects of their regulation". Plant Physiol. Vol.44 (1969) 849-853.
  25. Espejo, A., Sánchez R., González, R., Silva, A., Merchán P. y Nouel, G. 2006. Producción de biomasa de la lenteja de agua (*Lemna minor*), fertilizada con estiércol de ovinos. Arch. Latinoamericano de Producción Animal. 14 (3): 84-85.
  26. Smith D., McKenzie M., Bowe C. y Martin D. "Uptake of phosphate and nitrate using laboratory cultures of *Lemna minor*. Florida Scientist. Vol.67, N° 2 (2005)105-117.
  27. León C. y Chaves D. 2010. Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua, *Lemna aequinoctiales* y un humedal subsuperficial en Costa Rica. Rev. Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal 1(2): 155-177.

Recibido el 6 de Febrero de 2012

En forma revisada 8 de Abril de 2013