



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**BIOABSORCIÓN DE FÓSFORO Y COMPUESTOS
NITROGENADOS EN AGUA POR MEDIO DE
PLANTAS ACUÁTICAS FLOTANTES DEL
GÉNERO *Lemna***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

DIANA YOUNG FERNÁNDEZ GRANDIZO

TUTORES DE TESIS:

**DRA. MARÍA ISABEL SAAD VILLEGAS
DR. LUIS FELIPE JUÁREZ SANTILLÁN**



2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Bioabsorción de fósforo y compuestos nitrogenados en agua por medio de plantas acuáticas flotantes del género
Lemna

realizado por Young Fernández Grandizo Diana con número de cuenta 4-0505603-5 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Manuel Jiménez Estrada

Propietario M. en B. María Eugenia Muñoz Díaz de León

Propietario Dra. María Isabel Saad Villegas
Tutora

Suplente Dra. María Concepción García Aguirre

Suplente M. en Q. Luis Felipe Juárez Santillán

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 24 de marzo de 2010

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

*nlm.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Young
Fernández Grandizo
Diana
5658-3648 (dianayoungfg@gmail.com)
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
40505603-5

2. Datos del tutor

Dra.
María Isabel
Saad
Villegas

3. Datos del co-tutor

Dr.
Luis Felipe
Juárez
Santillán

4. Datos del sinodal 1

Dr.
Manuel
Jiménez
Estrada

4. Datos del sinodal 2

M. en B.
María Eugenia
Muñiz
Díaz de León

4. Datos del sinodal 3

Dra.
María Concepción
García
Aguirre

3. Datos de la tesis

Bioabsorción de fósforo y compuestos nitrogenados en agua por medio de plantas acuáticas flotantes del género *Lemna*
78 p.
2010

4. Palabras clave

Remoción, nitrógeno, fósforo, *Lemna*, cultivo, tratamiento de agua, fitorremediación.

Agradecimientos

A mis asesores, Dra. Ma. Isabel Saad Villegas y Dr. Luis Felipe Juárez Santillán.

A los maestros y doctores que apoyaron en la culminación de esta tesis, Dr. Manuel Jiménez Estrada, M. en B. María Eugenia Muñiz Días de León, M. en C. Martha Virginia Olvera García, M. en C. Pedro Ramírez García, M. en C. Agustín Quiroz Flores, Dra. María Concepción García Aguirre y Dra. Margarita Collazo Ortega.

Al Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, por autorizar la colecta del material biológico, a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la casa que dio lugar al proyecto y a la Universidad Autónoma de Hidalgo por prestar sus instalaciones para la realización de algunos experimentos.

A Las Cañadas, especialmente a Ricardo Romero y Karla Arroyo por inspirarme.

A mis compañeros de taller, Felipe, Adriana, Tanni, Rosa, Ale y Ana, por hacer más agradable mi estancia.

Dedicatoria

Agradezco y dedico este trabajo especialmente a mi familia, Dora, Regina y Daniel, a Eric y a mis abuelos Jesús y Virginia por apoyarme siempre.

Índice

1.-Introducción	1
2.-Marco Teórico	3
2.1.- Causas de contaminación de aguas	3
2.2.- Contaminación por nutrientes	3
2.3.- Plantas de tratamiento de agua	3
2.4.- Normatividad para agua tratada y residual en México	4
2.5.- Biorremediación	5
2.6.- Fitorremediación	6
2.7.- Características de una planta candidata para fitorremediación en un sistema acuático	6
2.8.- Lemnáceas	7
2.8.1.- Distribución de las lemnáceas	9
2.8.2.- Género <i>Lemna</i>	10
2.9.- Usos de <i>Lemna</i> spp.	13
2.10.- Cultivos de <i>Lemna</i> spp.	13
2.11.- Remoción de metales pesados por <i>Lemna</i> spp.	15
2.12.- Remoción de nitrógeno y fósforo por <i>Lemna</i> spp.	15
2.12.1.- Nitrógeno	15
2.12.2.- Fósforo	18
2.13.- Relación entre pigmentos y nutrientes	19
2.14.- Utilización de <i>Lemna</i> spp. en humedales artificiales	20
2.15.- Uso de <i>Lemna</i> spp. en biorreactores (lagunas de lemnáceas)	22
2.16.- Justificación	23
3.- Objetivos	24
4.- Métodos	25
4.1.- Material biológico	26
4.2.- Optimización de las condiciones de cultivo	26
4.2.1.- Medios de cultivo	26
4.2.1.1.- Desarrollo de <i>Lemna gibba</i> ante Hoagland y Steinberg	26
4.2.1.2.- Desarrollo de <i>L. gibba</i> ante distintas concentraciones de Hoagland	27
4.2.2.- Evaluación del crecimiento	27
4.2.2.1.- Análisis de datos	29
4.2.3.- Factores ambientales	29
4.2.3.1.- Cantidad de inóculo	29
4.2.3.2.- pH	30
4.2.3.3.- Condiciones de iluminación	30
4.3.- Bioabsorción de compuestos nitrogenados y fosfato	30

4.3.1.- Remoción de compuestos nitrogenados y fosfato	31
4.3.2.- Evaluación del crecimiento	31
4.3.3.- Determinación de clorofila	31
5.- Resultados y Discusión	32
5.1.- Optimización de las condiciones de cultivo	32
5.1.1.- Medios de cultivo	32
5.1.1.1.- Desarrollo de <i>Lemna gibba</i> ante Hoagland y Steinberg	32
5.1.1.2.- Desarrollo de <i>L. gibba</i> ante distintas concentraciones de Hoagland	33
5.1.2.- Evaluación del crecimiento	33
5.1.2.1.- Número de individuos	33
5.1.2.2.- Número de frondas	36
5.1.2.3.- Número total de individuos muertos	37
5.1.2.4.- Área cubierta	38
5.1.2.5.- Peso fresco y peso seco final	40
5.1.3.- Factores ambientales	42
5.1.3.1.- Cantidad de inóculo	43
5.1.3.2.- pH	43
5.1.3.3.- Condiciones de iluminación	46
5.2.- Bioabsorción de compuestos nitrogenados y fosfato	47
5.2.1.- Remoción de compuestos nitrogenados y fosfato por tratamiento	47
5.2.1.1.- Tratamiento 1	47
5.2.1.2.- Tratamiento 2	48
5.2.1.3.- Tratamiento 3	50
5.2.1.4.- Tratamiento 4	52
5.2.1.5.- Tratamiento 5	53
5.2.1.6.- Comentarios generales sobre la remoción	55
5.2.2.- Evaluación del crecimiento	57
5.2.2.1.-Área cubierta	57
5.2.2.2.- Biomasa	60
5.2.3.- Determinación de clorofila	62
6.- Conclusiones	66
7.- Referencias	67
8.- Anexos	74

Índice de Figuras

Figura 1. Géneros que conforman la familia Lemnaceae.	9
Figura 2. Hábitat potencial de plantas de la familia Lemnaceae.	10
Figura 3. Morfología de <i>Lemna gibba</i> L.	12
Figura 4. Conversión de compuestos nitrogenados durante la nitrificación y desnitrificación.	16
Figura 5. Interacción entre compuestos nitrogenados en un cuerpo de agua.	17
Figura 6. Diagrama de flujo de la estrategia metodológica.	25
Figura 7. Método de muestro para obtener la superficie cubierta por <i>Lemna gibba</i> .	28
Figura 8. Deseccación de las plantas para obtener el peso seco.	28
Figura 9. <i>Lemna gibba</i> en distintos medios de cultivo.	33
Figura 10. Número de individuos por medio de cultivo.	34
Figura 11. Prueba Tukey para el número de individuos al último día en cada medio de cultivo.	35
Figura 12. Número de frondas por medio de cultivo.	36
Figura 13. Prueba Tukey para el número de frondas por cada medio de cultivo.	37
Figura 14. Número total de individuos muertos en cada uno de los medios de cultivo.	38
Figura 15. Área cubierta en cm ² en cada medio de cultivo.	39
Figura 16. Prueba de Tukey para el área cubierta en cada medio de cultivo.	39
Figura 17. Comparación del peso fresco y peso seco por cada tratamiento.	41
Figura 18. Prueba Tukey para el peso seco en cada medio de cultivo.	41
Figura 19. Área cubierta ante distinto pH y significancia (P<0.05) según la prueba de Tukey para el crecimiento de <i>L. gibba</i> .	45
Figura 20. Seguimiento de la remoción de N-NH ₄ ⁺ en el Tratamiento 1.	48
Figura 21. Seguimiento de la remoción de P-PO ₄ ³⁻ y N-NO ₃ ⁻ del Tratamiento 1.	48
Figura 22. Seguimiento de la remoción de N-NH ₄ ⁺ en el Tratamiento 2.	49
Figura 23. Seguimiento de la remoción de N-NO ₃ ⁻ en el Tratamiento 2.	49
Figura 24. Seguimiento de la remoción de P- PO ₄ ³⁻ en el Tratamiento 2.	50
Figura 25. Seguimiento de la remoción de N-NH ₄ ⁺ y N-NO ₃ ⁻ en el Tratamiento 3.	51
Figura 26. Seguimiento de la remoción de P-PO ₄ ³⁻ en el Tratamiento 3.	51
Figura 27. Seguimiento de N-NO ₂ ⁻ en el Tratamiento 3.	52
Figura 28. Seguimiento de la remoción de N-NH ₄ ⁺ en el Tratamiento 4.	53
Figura 29. Seguimiento de la remoción de N-NO ₃ ⁻ y P- PO ₄ ³⁻ en el Tratamiento 4.	53
Figura 30. Seguimiento de la remoción de N-NH ₄ ⁺ y N-NO ₃ ⁻ en el Tratamiento 5.	54
Figura 31. Seguimiento de la remoción de P-PO ₄ ³⁻ en el Tratamiento 5.	54
Figura 32. Seguimiento del N-NO ₂ ⁻ en el Tratamiento 5.	55
Figura 33. Área cubierta por <i>Lemna gibba</i> en cada tratamiento.	58
Figura 34. Peso fresco y peso seco de <i>L. gibba</i> ante distintas concentraciones de N y P.	61
Figura 35. Fotografía de <i>L. gibba</i> ante cada tratamiento.	63
Figura 36. Concentración de clorofila a y clorofila b en mg/g de peso fresco de <i>L. gibba</i> ante distintas proporciones de N:P.	64

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Límites máximos permisibles para descargas de agua residual según la NOM-001-SEMARNAT-1996.	5
Cuadro 2. Condiciones de cultivo de <i>Lemna</i> spp. reportadas en la literatura.	14
Cuadro 3. Proporción de N:P según el método de Al-Hamdani y Sirna (2008).	31
Cuadro 4. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación para el número de individuos en cada medio de cultivo.	34
Cuadro 5. Anova para el número de individuos entre medios de cultivo.	35
Cuadro 6. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación para el número de frondas por medio.	36
Cuadro 7. Anova para el número de frondas por medio de cultivo.	37
Cuadro 8. Anova para el área cubierta en cada medio de cultivo.	39
Cuadro 9. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación para el área cubierta por medio.	40
Cuadro 10. Anova para el peso seco en cada medio de cultivo.	41
Cuadro 11. Porcentaje de área cubierta, frondas cloróticas, medición cualitativa del vigor de las frondas, presencia de algas y peso fresco y seco ante la variación de los factores ambientales para el cultivo de <i>L. gibba</i> .	44
Cuadro 12. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de <i>L. gibba</i> ante distinto pH.	45
Cuadro 13. Resultados de la prueba Bonferroni para el área cubierta.	59
Cuadro 14. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación para el área cubierta por <i>L. gibba</i> ante cada tratamiento.	60
Cuadro 15. Resultados de la prueba Bonferroni para peso fresco y seco.	61
Cuadro 16. Resultados de la prueba Bonferroni para la concentración de clorofila a.	65

Simbología y abreviaturas:

F: valor que denota la significancia estadística según la prueba de Fisher.

Lm: lumen, unidad de medida para flujo luminoso.

N₂: gas nitrógeno.

NH₃/ NH₄⁺: amonio.

NH₃: amoniaco, forma no ionizada del amonio.

NH₄⁺: ion amonio.

N-NH₄⁺ nitrógeno en forma amoniacal.

N-NO₂⁻: nitrógeno en forma de nitrito.

N-NO₃⁻: nitrógeno en forma de nitrato.

NO₂⁻: nitrito.

NO₃⁻: nitrato.

P- PO₄³⁻: fósforo en forma de fosfato.

P: significancia estadística, valor a partir del cual una variable es significativamente diferente o no. Probabilidad del error de aceptar un resultado como válido.

PAR: siglas en ingles de radiación fotosintéticamente activa.

R: coeficiente de correlación, proporción de relación lineal entre variables.

td: tiempo de duplicación.

Vc: velocidad de crecimiento.

μmol/m²/s: micromol por metro cuadrado en un segundo, unidad de medición de PAR.

Resumen

Las plantas acuáticas juegan un papel importante en los cuerpos de agua lacustres y lénticos ya que contrarrestan muchos de los problemas que en conjunto provocan la eutrofización. La eficiente absorción de metales pesados y nutrientes contaminantes del sistema, así como la creación de condiciones favorables para la descomposición microbiana de materia orgánica, son algunas características que la fitorremediación ha aprovechado para utilizar a las plantas acuáticas como organismos remediadores. Una de las plantas acuáticas flotantes más utilizadas en absorción de contaminantes son las plantas de la familia Lemnaceae, dentro de la cual la especie *Lemna gibba* L. tienen mayor importancia.

El objetivo del presente trabajo fue optimizar las condiciones de cultivo y uso de *Lemna gibba* para la absorción de compuestos nitrogenados y fosfatos, con el fin de mejorar sistemas de remoción de nutrientes en el agua. El método consistió en someter a la planta ante distintos medios de cultivo y diferentes condiciones ambientales como variación del pH, iluminación y cantidad de inóculo para establecer las condiciones óptimas. Asimismo se determinó la eficiencia de remoción de los contaminantes ante distintas proporciones de N:P para simular las concentraciones que se encuentran tanto en la naturaleza, como en ambientes eutróficos.

El cultivo de *Lemna gibba* se vio favorecido ante el medio de cultivo Hoagland al 25%, con un pH de 4.5 a 8.5, una radiación fotosintéticamente activa de $21.55 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y un inóculo que cubriera aproximadamente un 40% del área. El crecimiento y vigor de *Lemna gibba*, expresado como producción de biomasa, área cubierta y concentración de clorofila a y b, incrementó significativamente en los tratamientos que contaban con alta concentración de nitrógeno. Este desarrollo se mostró independiente a la variación de fósforo y se observó que el tiempo de retención de la planta en el agua a remediar, varió dependiendo el compuesto a eliminar.

La utilización de *Lemna gibba* para el tratamiento de agua que contengan nitrógeno y fósforo en altas concentraciones, es una opción viable y eficiente para fitorremediar cuerpos de agua contaminados.

1 Introducción

La fitorremediación es considerada una opción efectiva y de bajo costo para retirar contaminantes de distintas áreas (Weis y Weis, 2004), tanto terrestres como acuáticas (Garbisu y Alkorta, 2001). Esta tecnología emergente utiliza plantas para remover metales pesados y compuestos orgánicos e inorgánicos del ambiente o para disminuir el efecto nocivo de ciertos contaminantes, por lo que ésta surge como un método prometedor para remediar sistemas contaminados (Garbisu y Alkorta, 2001).

En los cuerpos de agua los compuestos nutritivos son considerados contaminantes al encontrarse en una concentración mayor a la normal. Los nitratos y fosfatos son aportados por aguas residuales tanto urbanas como agrícolas, y aguas provenientes de plantas de tratamiento, que desembocan en sistemas lacustres (Ansari y Khan, 2006). El aumento de la concentración de estos nutrimentos puede propiciar la eutrofización del sistema (Carpenter, 2005).

La eutrofización se ha convertido en un problema global, el cual se intensifica a medida que aumenta la población humana, lo que conduce a una mayor demanda de alimento y como consecuencia el cambio de uso de suelo. Esto a su vez requiere un mayor uso de fertilizantes, los cuales incrementan la concentración de nutrientes en cuerpos de agua. La eutrofización es el proceso de sobre enriquecimiento de un cuerpo de agua en el cual se desencadena un florecimiento de algas y se favorece la formación de un sistema anóxico (Carpenter, 2005).

En la actualidad, muchos cuerpos de agua presentan eutrofización principalmente por el aporte de nutrientes como el fósforo y nitrógeno, los cuales estimulan el crecimiento de algas y plantas acuáticas. Un medio acuático altamente enriquecido favorece el crecimiento acelerado de algas impidiendo el paso de la luz a estratos inferiores del cuerpo de agua. Por otra parte, hay un aporte acelerado de materia orgánica que al descomponerse, consume el oxígeno existente. Esto provoca la muerte de peces y otros organismos, creando un ciclo aparentemente sin salida (Carpenter, 2005; Khan y Ansari, 2005).

Las macrófitas o plantas acuáticas juegan un papel importante en los ecosistemas lacustres y lénticos, dado que utilizan los nutrientes del agua e incorporan el oxígeno y el dióxido de carbono atmosféricos (Arroyave, 2004; Gray, 2004). Los ecosistemas dominados por macrófitas son altamente productivos, ya que éstas poseen la habilidad de crear condiciones favorables para la descomposición microbiana de materia orgánica (Brix y Schierup, 1989). Su uso es eficiente pues cuentan con una tasa de crecimiento rápido (Bowers-Irons, 1992), facilitando así su cultivo y su consecuente utilización en humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales (Seoáñez y Gutiérrez, 1999).

Una de las plantas acuáticas flotantes más utilizadas en bioensayos de absorción de contaminantes, son las plantas de la familia Lemnaceae, dentro de las cuales el género *Lemna* L., tienen mayor importancia (Arroyave, 2004). Estas pequeñas plantas cuentan con la habilidad de absorber eficientemente metales pesados y nutrientes de cuerpos de agua contaminados. A pesar de sus ya conocidas características, se requiere generar más información en cuanto a los factores que afectan la absorción de contaminantes para mejorar el sistema de remoción en el agua (Tront y Saunders, 2006). En el presente trabajo se estudió la eficiencia de la absorción de compuestos con fósforo y nitrógeno por plantas del género *Lemna*, con la intención de optimizar algunos parámetros para su utilización en sistemas de biotratamiento.

2 Marco Teórico

2.1 Causas de contaminación de aguas

La creciente urbanización, industrialización y sobrepoblación ha llevado a una grave degradación del ambiente. Los cuerpos de agua se han visto seriamente afectados, ya que se han convertido en vertederos de aguas residuales y otros desechos por mucho tiempo (Dhote y Dixit, 2008). La utilización del agua tanto en la agricultura como en la industria y su uso municipal (domicilios y comercios) es poco eficiente, se desperdicia en gran medida y se aporta gran cantidad de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos. Estos compuestos de agua residual llegan a los cuerpos acuáticos directamente o por canalización del drenaje e interfieren con el equilibrio del sistema.

2.2 Contaminación por nutrientes

Los nutrientes en bajas concentraciones pueden ser utilizados tanto por vegetales como por microorganismos, pero a medida que su concentración aumenta, los nutrientes se vuelven contaminantes y al cambiar las condiciones de reciclaje, es decir de los ciclos biogeoquímicos, se vuelven inutilizables (Carpenter, 2005). Por lo tanto, un lugar rico en nutrientes, se vuelve pobre en recirculamiento de minerales (Ran *et al.*, 2004). El constante aporte de agua residual a cuerpos acuáticos sin previo tratamiento hace que se incremente la concentración de nutrientes, esto indudablemente desequilibrará el cuerpo de agua provocando eutrofización (Young-Ho, 2006). Hinesly y Jones (1990), en Khan y Ansari (2005), mencionan que cuerpos de agua que contengan más de 0.05 mg/L de fósforo podrían presentar condiciones eutróficas; mientras que Al-Hamdani y Sirna (2008) indican concentraciones mayores a 0.1 mg/L.

2.3 Plantas de tratamiento de agua

Una planta de tratamiento de agua busca remover o estabilizar los contaminantes básicos presentes en aguas residuales, por medio de distintos procesos, llamados en

conjunto, tren de tratamiento. Las plantas de tratamiento cuentan con varios sistemas, que se nombran según el lugar que ocupan en el proceso: tratamiento primario, secundario o terciario. En el tratamiento primario, el agua se hace pasar por un filtro y/o un sedimentador para remover partículas grandes, es decir, se utilizan métodos físicos de separación de contaminantes. En el tratamiento secundario se utilizan métodos químicos y/o biológicos para depurar el agua; en especial se utiliza la degradación microbiana de materia orgánica para transformarla en biomasa celular (Dinges, 1978). Los métodos químicos para purificar agua suelen ser costosos y por lo general son contaminantes (Dhote y Dixit, 2008). Los tratamientos secundarios hacen que el agua pierda más del 90% de materia orgánica, pero dependiendo de la naturaleza del agua a tratar, el efluente puede mantener compuestos orgánicos recalcitrantes, compuestos tóxicos de diferente naturaleza y una abundante cantidad de compuestos nitrogenados y fosfatos (Dinges, 1978). El llamado tratamiento terciario, puede o no estar presente en las plantas de tratamiento. Por lo general, no cuentan con él. Este tratamiento tiene muchas variantes que dependen de las sustancias que se quieren remover, algunos ejemplos son la filtración fina por arenas o carbón activado, lagunas de oxidación y la utilización de plantas acuáticas para eliminar sales minerales y metales pesados del agua antes de que el efluente de la planta de tratamiento sea destinado a otro uso o vertido al alcantarillado.

2.4 Normatividad para agua tratada y residual en México

La Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997, establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se usen en servicios al público. En dicha norma se define que toda agua residual es aquella que cuenta con una composición variable, proveniente de descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas. Esta agua, junto con la pluvial, ingresa a las plantas de tratamiento (Rauch y Harremoes, 1996), en donde por medio de distintos procesos, físicos, químicos y/o biológicos, es depurada para hacerla apta para reutilizarla. En algunos casos, uno de

los tratamientos de agua comprende a las lagunas de oxidación o estabilización, en las cuales el agua es ingresada a un estanque a cielo abierto donde la microbiota natural (algas, bacterias y protozoarios) utiliza los compuestos, por lo que son eliminados del sistema (Caicedo, 2005).

Por otra parte, la NOM-001-SEMARNAT-1996 indica los límites permisibles de nitrógeno o fósforo totales en las descargas de aguas residuales. Estos valores se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Límites máximos permisibles para descargas de agua residual según la NOM-001-SEMARNAT-1996.

Parámetro	Ríos				Embalses naturales y artificiales				Suelo		Humedales naturales	
	Riego agrícola		Público urbano		Riego agrícola		Público urbano		Riego agrícola			
	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.	P.M.	P.D.
Nitrógeno total (mg/L)	40	60	40	60	40	60	15	25	NA	NA	NA	NA
Fósforo total (mg/L)	20	30	20	30	20	30	5	10	NA	NA	NA	NA

P.M.: promedio mensual.

P.D.: promedio diario.

NA: no es aplicable.

2.5 Biorremediación

La biorremediación es una tecnología emergente que utiliza organismos vivos para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos o atenuar su efecto en suelo, agua y aire. En comparación con métodos fisicoquímicos, los métodos biológicos suelen ser más efectivos y de menor costo, por lo que es conveniente utilizarlos (Young-Ho, 2006).

2.6 Fitorremediación

La fitorremediación es una de las ramas dentro de la biorremediación que se enfoca en el uso de plantas para absorber, acumular, retirar o inactivar contaminantes. Existen seis divisiones de la fitorremediación: la fitoextracción, la cual retira los compuestos contaminantes del suelo o del aire al absorberlos; la rizofiltración, donde la parte de la planta que absorbe los contaminantes es la raíz en medios acuáticos; la fitoestimulación, que consiste en que la planta genere los exudados radiculares que estimulan el crecimiento de microorganismos capaces de degradar algunos compuestos; la fitoestabilización, la cual retiene o inactiva al contaminante para que no esté biodisponible para otros organismos o que sea movilizado a otro lugar; la fitodegradación, que transforma los contaminantes orgánicos en moléculas más simples; y la fitovolatilización, que se produce cuando el contaminante llega a las hojas y se evapotranspira (López *et al.*, 2005; Salt *et al.*, 1995).

2.7 Características de una planta candidata para fitorremediación de un sistema acuático

Los humedales son sistemas acuáticos naturales permanentes o temporales que se caracterizan por la presencia de plantas acuáticas. La vegetación de los humedales se compone por plantas acuáticas de varios tipos (Gray, 2004; Seoáñez y Gutiérrez, 1999), los cuales tienden a ser clasificados en:

- a) Macrófitas emergentes enraizadas al fondo como *Typha latifolia* L. (aneas) o *Juncus* sp. L.
- b) Macrófitas de hojas flotantes enraizadas al fondo como *Nymphaea alba* L. (nenúfares) y *Nelumbo* spp. Adans. (lotos).
- c) Macrófitas sumergidas enraizadas al fondo como *Elodea canadensis* Michx.
- d) Macrófitas sumergidas libres como *Utricularia* spp. L.
- e) Macrófitas libres flotantes como *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (jacinto de agua) y *Lemna* spp. L. (chichicastle o lenteja de agua).

A pesar de que todas las plantas acuáticas absorben nutrientes del agua, algunas son más eficientes que otras. Para poder conocer si una planta es una buena candidata para ser utilizada en el tratamiento de aguas, existen varias características que deben tomarse en cuenta (Arroyave, 2004; Caicedo, 2005; Gray, 2004; Monette *et al.*, 2006; Weis y Weis, 2004):

- a) rápida proliferación
- b) facilidad de cosecha
- c) bajo contenido de agua
- d) alto contenido de proteína
- e) bajo contenido de fibras y lignina
- f) alta capacidad de absorción de nutrientes
- g) baja susceptibilidad a muchas plagas
- h) bioacumulación de contaminantes del agua
- i) nula toxicidad para humanos y animales
- j) periodos extendidos de crecimiento y cosecha
- k) que pueda procesarse en subproductos utilizables

En el caso de contaminación del agua, la fitorremediación ha sabido aprovechar, en cuanto a estos parámetros, las características sobresalientes de ciertos grupos botánicos para la remediación de cuerpos lacustres y lénticos. Un grupo de plantas acuáticas que cuenta con la mayoría de las características antes mencionadas, son las macrófitas del género *Lemna* (Ran *et al.*, 2004), las cuales han sido muy utilizadas en investigaciones sobre absorción, tanto de metales pesados como de compuestos orgánicos e inorgánicos.

2.8 Lemnáceas

La familia Lemnaceae se compone de macrófitas libres flotantes, pertenecientes a las angiospermas (plantas con flor) monocotiledóneas. El grupo se conforma por 4 géneros: *Spirodela* Schleid., *Lemna* L., *Wolffia* Horkel ex Schleid. y *Wolffiella* Hegelm.

(Cole y Voskuil, 1996) (Figura 1). En conjunto, la familia cuentan con 38 especies distribuidas en todo el mundo (Les *et al.*, 2002).

Las lemnáceas son plantas diminutas que cuentan con hojas, llamadas frondas, de color verde brillante; su cuerpo es vegetativo de forma taloide, es decir que no se diferencian el tallo y las hojas. La presencia de una o varias raíces, o incluso su ausencia, son características que separan los géneros (Figura 1). Su reproducción es principalmente vegetativa y su biomasa tiende a duplicarse de 1 a 5.3 días en condiciones óptimas. El tamaño de las lemnáceas es fácilmente influenciado por las condiciones del ambiente (Landolt, 1975).

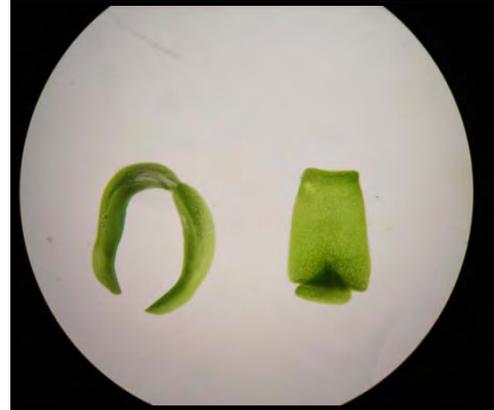
Según Oron (1994) la tasa de crecimiento relativo para *Lemna* sp. es comparativamente alto en relación con otras plantas acuáticas, el cual llega a ser de 0.10 a 0.35 g/día. En aguas eutróficas este rápido crecimiento lleva a la formación de tapetes que cubren la superficie del cuerpo de agua, los cuales, provocan una disminución de la concentración del oxígeno disuelto. Así el contenido de materia orgánica incrementa y se genera un ambiente anaerobio (Gray, 2004), por lo que se sugiere cosechar parte de la cubierta periódicamente para promover su crecimiento continuo y no afectar el equilibrio del sistema (Bouda y Chien, 2005; Journey *et al.*, 1991; Oron, 1994; Ran *et al.*, 2004).

Las lemnáceas en general son plantas resistentes a plagas y enfermedades, pueden crecer incluso en aguas ligeramente salinas o en aguas sin tratamiento previo. Crean un ambiente favorable para el zooplancton como *Daphnia* sp. O. F. Müller (Gray, 2004) y otros microorganismos.



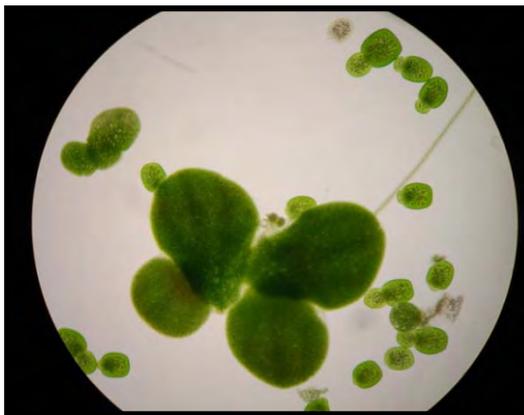
Wolffia sp.

(0.8 mm de largo y 0.5 mm de ancho*)



Wolffia sp.

(7 mm de largo y 1 mm de ancho)



Lemna sp.

(2 a 4 mm de largo y 2 mm de ancho*)



Fuente: http://fleurs.cirad.fr/fleurs_d_europe/s/spirodella_polyrrhiza

Spirodela sp.

(4.7 mm de largo y 2.6 mm de ancho**)

Figura 1. Géneros que conforman la familia Lemnaceae.

Entre paréntesis se muestra el tamaño aproximado de las frondas.

Fuentes: *Arroyave, 2004; **Landolt y Kandeler, 1987.

2.8.1 Distribución de las lemnáceas

La familia Lemnaceae cuenta con una distribución cosmopolita (Figura 2), a excepción de los desiertos y regiones polares (Gray, 2004); se le encuentra comúnmente en charcos de agua dulce, ciénagas, lagos e incluso en ríos calmados (Arroyave, 2004).

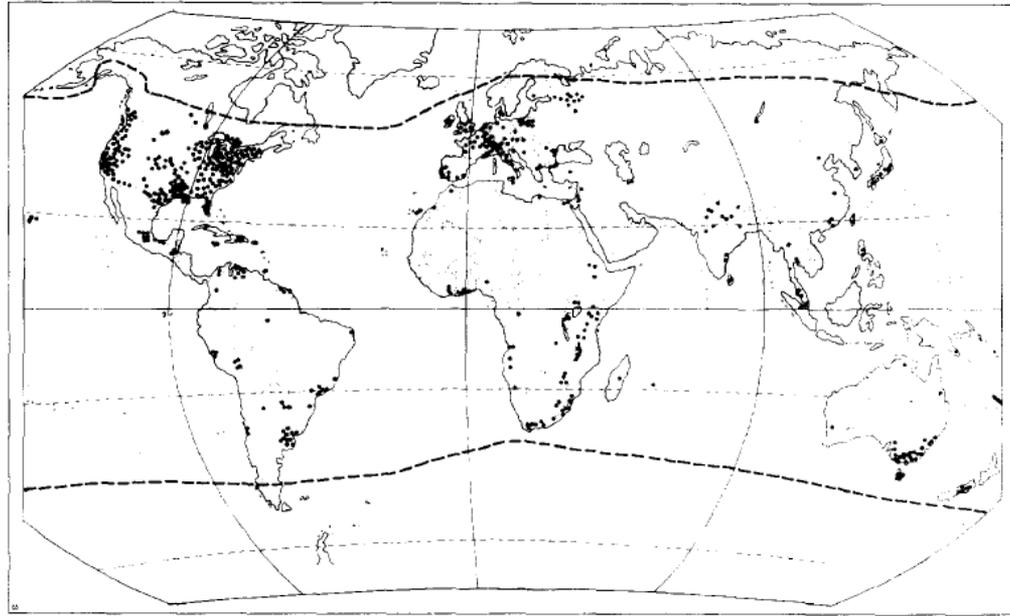


Figura 2. Hábitat potencial de plantas de la familia Lemnaceae. La línea punteada marca los límites de su distribución y los puntos la procedencia de especies estudiadas por Landolt (1975).

Fuente: Landolt, 1975.

2.8.2 Género *Lemna*

El género *Lemna* cuenta con 13 especies, 7 de ellas se encuentran en México (Landolt, 1985), a todas se les conoce comúnmente como chichicastle o lenteja de agua, en inglés “duckweed” (Arroyave, 2004; Landolt, 1985). Este género se diferencia de las demás lemnáceas por contar con una sola raíz, delgada y de color blanco o verdusca (Figura 3). La lenteja de agua es una planta monoica, con flores unisexuales. Las flores masculinas están constituidas por un solo estambre y las flores femeninas consisten en un pistilo formado por un solo carpelo, sin presencia de perianto. Las flores nacen de una hendidura ubicada en el borde basal de la fronda, dentro de una bráctea denominada espata, muy común en las especies del orden Arales. El fruto contiene de 1 a 4 semillas (Arroyave, 2004). La forma más común de reproducción es la asexual, por gemación (Landolt, 1985; Vermaat y Hanif, 1998). En la espata se desarrolla una yema pequeña que origina una fronda nueva, la cual se separa más tarde de la planta progenitora (Arroyave, 2004). La vida de las frondas es de 5 a 6 semanas (Wardlaw, 1952). Es común encontrar las plantas agregadas

formando grupos de 2 a 4 individuos o más, dependiendo de la especie (Arroyave, 2004).

Una de las especies más mencionadas en la literatura es *Lemna minor* L., sobre la cual se han hecho numerosos estudios de bioensayos y absorción de nutrientes (Arroyave, 2004); específicamente para México, se han realizado varios trabajos con *Lemna gibba* (Miranda, 1998; Miranda e Ilangovan, 1996; Miranda *et al.*, 2000).

La propagación asexual de la lenteja de agua es relativamente fácil. La planta puede desarrollarse en un rango amplio de temperaturas, el cual varía entre 4° y 37°C, con un crecimiento óptimo a los 24°C (Landolt, 1985). Las lemnáceas se adaptan bien a cualquier condición de iluminación y crecen rápidamente en agua rica en nutrientes, con altos niveles de nitrógeno y fósforo. Con frecuencia el hierro es un elemento limitante para su adecuado desarrollo. Pueden tolerar un amplio rango de pH (Arroyave, 2004). La planta no puede establecerse en aguas de rápido movimiento, por lo que su crecimiento se observa en aguas lénticas, con un movimiento menor a 0.3 m/s (Leng *et al.*, 1995). Se ha observado que *Lemna* spp. crece en cualquier cuerpo de agua dulce, independientemente de la profundidad y de su extensión, lo que brinda una buena disponibilidad de la planta en cualquier zona de clima templado (Ngo, 1987).

Dados estos amplios rangos en los que *Lemna* sp. puede desarrollarse, su establecimiento se da fácilmente y su crecimiento es muy rápido. La cobertura de plantas flotantes como *Lemna* spp. reduce la probabilidad de que se presente la proliferación de algas y los consecuentes procesos de eutrofización en cuerpos de agua lénticos. Sin embargo, si se permite un crecimiento excesivo de la planta, se pueden generar problemas, porque se impide el intercambio gaseoso si alcanza a cubrir totalmente la superficie del cuerpo de agua (Arroyave, 2004); es por esto que se recomienda la cosecha de parte de la cubierta periódicamente (Journey *et al.*, 1991; Oron, 1994; Ran *et al.*, 2004; Bouda y Chien, 2005) y dado que *Lemna* spp.

forma un tapete sobre el agua y las plantas no están sujetadas al fondo, su cosecha es sencilla (Oron, 1994).

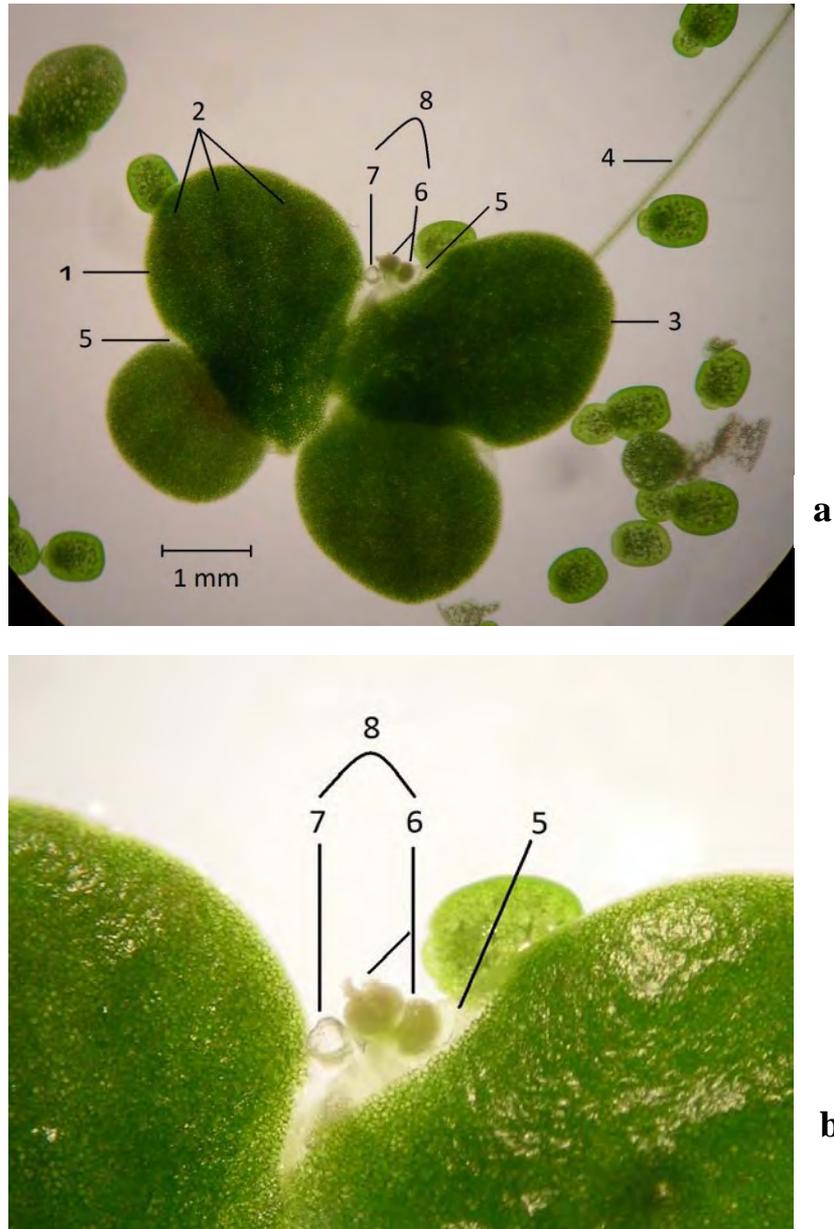


Figura 3. Morfología de *Lemna gibba* L. a) Estructuras de *L. gibba*. b) Acercamiento a estructuras reproductoras. 1. Fronda madre. 2. Nervadura. 3. Fronda hija. 4. Raíz. 5. Espata. 6. Estambre con anteras. 7. Estigma. 8. Flor.

2.9 Usos de *Lemna* spp.

Si la lenteja de agua es cultivada o cosechada de aguas residuales que no contienen metales pesados, se puede utilizar como alimento para ganado, aves de corral y peces (Haustein *et al.*, 1990; Journey, *et al.*, 1991; Palafox *et al.*, 2005; Ran *et al.*, 2004), porque tiene un valor proteico alto (Ran *et al.*, 2004), que usualmente se encuentra alrededor del 30% (Oron, 1994); llega a alcanzar 41% de proteína en estanques de estabilización de agua (Olguín *et al.*, 2000) e incluso 45% en canales con aporte de excretas de porcinos (Palafox *et al.*, 2005). La planta tiene en sus tejidos: entre 92% a 97% de agua (Gray, 2004), de 2.7% a 14% en peso seco de lignina y celulosa, y un contenido de fibras bajo (Landolt y Kandeler, 1987; Oron, 1994) entre 6.7 y 16.2% (Palafox *et al.*, 2005). Esta última característica hace que sea fácilmente digerible.

Si la zona donde prolifera la lenteja de agua contiene sustancias tóxicas o metales pesados, la biomasa obtenida deberá ser incinerada y tratada para recuperar posteriormente el metal, o bien, podría utilizarse en primera instancia para producir biogas (metano) por medio de digestión anaerobia y posteriormente recuperar el metal de los residuos (Arroyave, 2004; Jain *et al.*, 1992). Jain y colaboradores (1992) mencionan que a bajas concentraciones de cadmio y níquel, *Lemna* sp. mostró una mayor producción de biogas, en comparación con el producido por plantas no expuestas a metales pesados.

2.10 Cultivos de *Lemna* spp.

Como ya se ha mencionado, *Lemna* spp ha sido utilizada en numerosos estudios, en los cuales difieren tanto las condiciones de cultivo de la planta como los medios utilizados. Algunos de los medios de cultivo utilizados para *Lemna* spp. son: Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950; Miranda, 1998), Steinberg (Clatworthy y Harper, 1962), Steinberg modificado por Altenburguer (OECD, 2006), Huttner 1/10 (Körner *et al.*, 2003), Jacob (Bowers-Irons, 1992), SIS (OECD, 2006) y 20X AAP (OECD, 2006). En el Cuadro 2 se recopilan los distintos factores utilizados.

Cuando el cultivo de *Lemna* sp. se prolonga, el aspecto de la planta cambia, se torna de un color verde pálido, las raíces se alargan y el contenido de proteínas decrece, esto indica que los nutrientes se están agotando (Oron, 1994). *Lemna* sp. cuenta con una estrecha asociación con microalgas; aún en condiciones de laboratorio y con agua estéril se origina la presencia de éstas. Las microalgas logran alcalinizar y remover a una mayor velocidad el hierro, fósforo y nitrógeno del medio, por lo que disminuyen los nutrientes para el crecimiento de *Lemna gibba* (Morales *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Condiciones de cultivo de *Lemna* spp. reportadas en la literatura.

Área de cultivo	Profundidad	Temperatura óptima	Fotoperiodo y radiación fotosintéticamente activa	Características del medio de cultivo	Referencia
500 m ²	45 cm	24 °C	12 horas	-	Harvery y Fox (1973)
-	-	22.5 ± 1.5 °C	210 µmol/m ² /s	Hoagland 1:40 pH 6.7	Miranda e Ilangovan (1996)
0.09 m ²	14 cm	20 ± 1 °C	12.5 horas luz 342 mol/m ² /s	Hoagland y agua destilada compensado evaporación	Monette <i>et al.</i> (2006)
0.01 m ²	3.2 cm	30 ± 2 °C	12 horas 86 µmol/m ² /s	pH 3.5 - 9	Morales <i>et al.</i> (2006)
0.005 m ²	> 2 cm	24 ± 2 °C	85-135 µmol/m ² /s	pH 5.5 - 7.5	OECD (2006)
0.2 m ²	20-30 cm	22.9 °C	-	Agua residual doméstica	Oron (1994)
2 - 4 m de largo	30-40 cm	27 °C	-	pH 6.5 - 7.5 aporte de MO porcina	Palafox <i>et al.</i> (2006)

Como se puede observar en el Cuadro 2, las condiciones en las que se ha cultivado *Lemna* spp. son muy distintas; sin embargo, se ha observado que si el medio rebasa el pH óptimo, se induce un descenso del número de frondas hasta producir mortalidad en las plantas. Dependiendo de la fuente de nitrógeno del medio de cultivo, el pH que resulta óptimo para el crecimiento de *Lemna* spp. varía. Si se emplea urea o nitrato de amonio, el pH óptimo es de 4, si se usa nitrato de sodio, el pH ideal es de 6-7. Por otra parte, el cultivo de *Lemna* sp. a pH de 4 a 7 puede ser útil para controlar el crecimiento de microalgas, ya que ellas requieren de un pH más alto, alrededor de 9 (Morales *et al.*, 2006). El crecimiento de algas en un cuerpo de

agua puede variar significativamente el pH. Cuando las algas consumen el CO₂ durante el día, el valor de pH se incrementa, lo inverso sucede cuando las algas liberan CO₂ durante la respiración realizada por la noche (Zhen-Gang, 2008).

2.11.- Remoción de metales pesados por *Lemna* spp.

Existen muchos estudios sobre la absorción y los efectos de los metales pesados sobre *Lemna* spp. (Bowers-Irons, 1992; Garbisu y Alkorta, 2001; Jain *et al.*, 1992; Miranda *et al.*, 2000; Weis y Weis, 2004). La mayoría realizados con plomo y cromo (Chandra y Kulshreshtha, 2004; Miranda, 1998; Miranda *et al.*, 2000). *Lemna* sp. tiene una gran capacidad de acumulación de estos contaminantes, pero cuando se rebasan sus niveles de tolerancia, se presentan daños. Por ejemplo, en altas concentraciones de cromo se observa desorganización de tilacoides, con pérdida de granas y formación de varias vesículas en los cloroplastos (Chandra y Kulshreshtha, 2004).

2.12.- Remoción de nitrógeno y fósforo por *Lemna* spp.

Se han realizado numerosos estudios para analizar el efecto de *Lemna* spp. en la absorción tanto de compuestos nitrogenados como fosfatados (Harvery y Fox, 1973; Körner y Vermaat, 1998; Porath y Pollock, 1982; Zimmo, 2003) y se ha observado que su absorción está ligada al crecimiento de la planta (Al-Nozaily *et al.*, 2000). Caicedo (2005) realizó una recopilación de información sobre la remoción de nitrógeno y fósforo por lemnáceas, en la cual menciona rangos de 0.05 a 1.67 g/m²/d de nitrógeno y de 0.01 a 0.30 g/m²/d de fósforo removidos.

2.12.1.- Nitrógeno

El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes del planeta, representa aproximadamente el 78% de la atmósfera y es utilizado biológicamente para la síntesis de proteínas. El nitrógeno se encuentra en varias formas como por ejemplo gas (N₂), nitrato (NO₃⁻), nitrito (NO₂⁻) o amonio (NH₃/ NH₄⁺), por lo que hace complejo su ciclo al ser extremadamente reactivas. Referente a lo anterior, los compuestos nitrogenados tienen una gran habilidad para ganar o perder electrones (oxidarse o reducirse respectivamente) y propician el cambio entre las formas nitrogenadas (Zhen-Gang, 2008). La conversión de compuestos oxidados o reducidos se compone

de dos grandes procesos en un cuerpo de agua. La nitrificación es el proceso de oxidación bacteriana de amonio a nitrito y consecuentemente a nitrato; inversamente en condiciones anóxicas, la reducción bacteriana de nitrato a gas nitrógeno se llama desnitrificación (Figura 4).

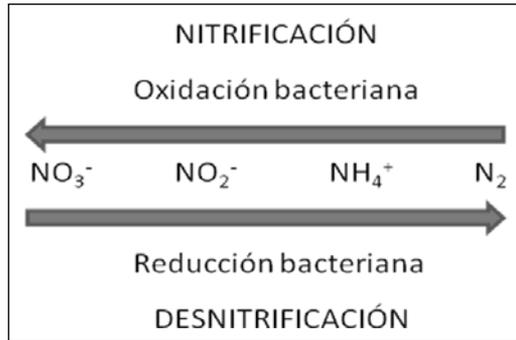


Figura 4. Conversión de compuestos nitrogenados durante la nitrificación y desnitrificación.

El primer paso en el ciclo del nitrógeno es la fijación, este proceso lo realizan bacterias de vida libre y simbióticas, las cuales toman el nitrógeno (N₂) desde la atmósfera; el segundo paso es la amonificación en donde el N₂ fijado es transformado a NH₄⁺; posteriormente viene la nitrificación en donde el NH₄⁺ se transforma a NO₃⁻, teniendo como intermediario al NO₂⁻. Este último producto generalmente se presenta en concentraciones pequeñas, por lo que en ocasiones no es detectado, ya que su transformación a NO₃⁻ es muy rápida (Viessman y Hammer, 2005). Finalmente, las plantas asimilan el nitrógeno durante el proceso de asimilación o absorción (Anger *et al.*, 2002).

El amonio total en un cuerpo de agua se compone por iones amonio (NH₄⁺) y su forma no ionizada (NH₃). Si en un cuerpo de agua el pH se acerca a la neutralidad, se encontrará que el 99.7% del nitrógeno amoniacal está en forma ionizada (NH₄⁺), mientras que ante pH de 12, el porcentaje se invierte (Lawson, 2002). Es por esto que la concentración de NH₄⁺ en un cuerpo de agua normalmente es mucho más alta que la de NH₃ y en general se reporta como nitrógeno amoniacal total. A pesar de que las plantas acuáticas absorben NH₄⁺ preferentemente, cuando disminuye su concentración también utilizan NO₃⁻ y NO₂⁻ (Zhen-Gang, 2008). Aunado a lo anterior,

el pH influye la conversión de otros compuestos nitrogenados como es el caso del nitrógeno gaseoso, el cual ante pH menor de 5 es convertido por reacciones químicas más que biológicas a amonio (NH_4^+) asimilable por las plantas (Gray, 2004).

La concentración de nitrógeno en un sistema puede ser variable, ya que hay muchos factores que influyen en la pérdida de nitrógeno en el medio como: la absorción por la planta, volatilización del amonio, asimilación del amonio por la biomasa de algas, nitrificación - desnitrificación biológica y cambios de temperaturas que aceleran el proceso de oxido-reducción de nitrógeno (Zimmo, 2003; Zimmo *et al.*, 2004). Las plantas acuáticas no pueden aprovechar directamente el nitrógeno orgánico por lo que se requiere que las bacterias lo descompongan en amonio (Al-Nozaily *et al.*, 2000). Sin embargo, Vermaat y Hanif (1998) mencionan que la desnitrificación es la ruta de mayor pérdida de nitrógeno por volatilizarse como N_2 (Figura 5).

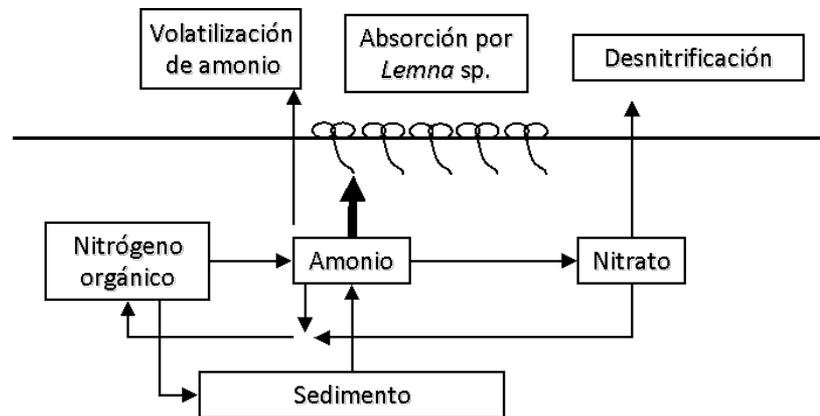


Figura 5. Interacción entre compuestos nitrogenados en un cuerpo de agua.

Fuente: Zimmo, 2003.

Existen otros factores que provocan la conversión de una forma de nitrógeno en otra, haciendo la cuantificación de cada compuesto una medición puntual. Por ejemplo, las bacterias de un humedal, fijan el nitrógeno atmosférico y lo modifican liberando nitrógeno aprovechable al medio, lo que puede cubrir la medición de la eficiencia de remoción de nitrógeno; asimismo, la incorporación de detritos al sustrato funciona

como una red de transferencia de nutrientes del agua al suelo (Gray, 2004). Los nitratos tienen un alto grado de movilidad en agua, se desplazan fácilmente en corrientes superficiales. El aprovechamiento del nitrógeno en forma de nitratos está en función del grado de nitrificación que sufra (Seoáñez y Gutiérrez, 1999).

Las lemnáceas pueden absorber el nitrógeno del agua en forma de amonio (NH_4^+) preferentemente y en segundo lugar en forma de nitrato (NO_3^-) (Leng *et al.*, 1995; Oron, 1994; Porath y Pollock, 1982); sin embargo, Morales *et al.* (2006) menciona que *Lemna sp.* utiliza más eficientemente las fuentes nitrogenadas en el siguiente orden: urea > nitrato de amonio > amonio > nitrato. Es interesante notar que *Lemna sp.* realiza la conversión directa de amonio para la síntesis de aminoácidos, la cual es de alta eficiencia (Oron, 1994).

En general se puede decir que la remoción de nutrientes por parte de las plantas es un factor importante en los sistemas acuáticos. Körner y Vermaat (1998) observaron que el 75% de la pérdida total de nitrógeno en un sistema de cultivo, se debió directa o indirectamente a *Lemna sp.*

Según Porath y Pollock (1982), *Lemna gibba* actúa como un removedor biológico muy eficiente de amonio. Absorbe el 80% de su contenido en el medio en 48 horas. Según los experimentos de Oron (1994), la remoción de amonio aumenta ante un mayor tiempo de retención de la planta, siendo de 40% a los 3 días, a 90% si el tiempo de retención es de 10 días. Asimismo menciona que la absorción de amonio en humedales poco profundos (20 cm) es mayor que en los profundos (30 cm) (Oron, 1994).

2.12.2.- Fósforo

A diferencia del nitrógeno, el fósforo no cuenta con compuestos volátiles. Las formas comunes del fósforo son las orgánicas, los ortofosfatos (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) y los polifosfatos. El fósforo es un nutriente vital para el crecimiento de autótrofos acuáticos y es un componente clave para convertir la luz en energía; este elemento

causa eutrofización cuando se encuentra en altas concentraciones, por lo que se considera determinante en el crecimiento (Zhen-Gang, 2008).

En los cuerpos de agua, los polifosfatos gradualmente son hidrolizados en soluciones acuosas y pasan a la forma de ortofosfatos (Viessman y Hammer, 2005), los cuales son asimilables por las plantas (Zhen-Gang, 2008). Los compuestos fosfatados pueden precipitar y ser adsorbidos por el sedimento en presencia de diferentes iones metálicos. Esto ocurre principalmente en medios que se encuentran estáticos, como lagunas o estanques (Viessman y Hammer, 2005; Zhen-Gang, 2008). En estos casos, el fósforo contenido en el agua no desciende a capas inferiores del suelo, por lo que se retiene en su superficie. Los iones de fosfato son rápidamente adsorbidos por hidróxidos de hierro y aluminio, es decir que son retenidos por las arcillas (Gray, 2004). Al aumentar la cantidad de fosfatos se incrementa su solubilidad, haciéndolo accesible para la vegetación (Seoáñez y Gutiérrez, 1999).

Varios autores mencionan que las lemnáceas son más efectivas para remover los nutrientes de aguas tratadas que otras plantas acuáticas como *Eicchornia crassipes* (Mart.) Solms (jacinto de agua), *Pistia stratiotes* L. (lechuga de agua), *Hydrocotyle umbellata* L. (hoja de agua, sombrerito de agua), *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. (lenteja de agua), *Azolla caroliniana* Willd. (helecho de agua), *Salvinia auriculata* Aubl. (oreja de agua) y *Egeria densa* (Planch.) Casp. (elodea). En particular, *Lemna* spp. suele tener una tasa mayor de remoción de fósforo (Gray, 2004; Reddy y Busck, 1985; Wang, 1990). Gray (2004) recomienda que para mantener la remoción de fósforo en cuerpos de agua con lemnáceas entre 90 y 95%, es importante mantener un alto contenido de nutrientes para conservar el incremento de biomasa.

2.13.- Relación entre pigmentos y nutrientes

Las clorofilas son un grupo de siete pigmentos que están presentes en plantas y algunas bacterias de color verde. Los pigmentos reflejan longitudes de onda específicas dentro del espectro visible, lo que hace que tengan algún color. Las clorofilas transforman la energía radiante en energía química durante la fotosíntesis. La clorofila a, debido a su función principal durante la fotosíntesis, es usada

frecuentemente como una medida indirecta de producción de biomasa fotosintética y por lo tanto puede dar indicios de un cuerpo de agua eutrófico (Zhen-Gang, 2008).

La concentración de clorofila de las plantas depende de la disponibilidad de nitrógeno; la concentración de clorofila de las hojas de frijoles comunes (*Phaseolus vulgaris* L.), disminuyó significativamente al verse reducida la concentración de nitrógeno (Lema *et al.*, 2000 en Al-Hamdani y Sirna, 2008). Se ha reportado que el incremento de clorofilas y carotenoides corresponde con un aumento en la tasa fotosintética en plantas acuáticas flotantes del género *Salvinia* (Nichols *et al.*, 2000 en Al-Hamdani y Sirna, 2008). Un aumento en la tasa fotosintética y un acelerado crecimiento, incrementados por la concentración de nitrógeno, se ha reportado en otras plantas como girasol (*Helianthus debilis* Nutt.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) (Al-Hamdani y Sirna, 2008).

2.14.- Utilización de *Lemna* spp. en humedales artificiales

Muchas plantas acuáticas han sido utilizadas en sistemas de tratamiento de agua residual, en particular en los humedales artificiales o “wetlands”. Éstos son sistemas acuáticos en condiciones lénticas que, al integrar la acción de las bacterias, algas, macrófitas y el suelo, consiguen depurar varios tipos de agua (Gray, 2004). Desde la década de 1970, los humedales artificiales se han utilizado para tratamiento secundario o terciario de aguas residuales urbanas (Gray, 2004). Los humedales artificiales también se han utilizado para tratar aguas residuales de minas y aguas provenientes de la agricultura y la actividad industrial (Hammer, 1989; Kadlec *et al.*, 2000).

Existen varios tipos de humedales artificiales (Seoáñez y Gutiérrez, 1999; Gray, 2004):

- Humedales subsuperficiales o SSF (Subsurface Flow). En estos humedales el flujo del agua se da por debajo del sustrato, el cual por lo general es grava y/o arenas con profundidades de 0.6 a 1 m. En el sustrato no solo enraízan las plantas, sino que también funciona como filtro y sustrato para bacterias que participan asimismo en la depuración del agua.

- Humedales de superficie libre de agua o FWS (Free Water Surface). Son los humedales en los que el flujo del agua es libre sobre el sustrato. Las profundidades recomendadas van desde 5 hasta 45 cm; se obtienen buenos resultados a los 20 cm. En este tipo de humedal se desarrolla gran cantidad de vegetación acuática y con frecuencia plantas del género *Lemna* (Gray, 2004; Ran *et al.*, 2004).

Si en un sistema de tratamiento se combinan ambos tipos de humedales, el efluente de agua tratada será de mejor calidad (Ran *et al.*, 2004). Los principales factores condicionantes en un humedal artificial son: profundidad, luz, tipo de sedimento (grava, arena, limos y/o arcillas), especies de macrófitas y microorganismos; también aparecen otros grupos como moluscos, insectos y crustáceos. La función de las bacterias en un humedal para tratamiento de aguas radica en consumir la materia orgánica y transformar compuestos como nitritos, amoníaco, compuestos de azufre, entre otros (Gray, 2004). Las plantas acuáticas utilizan los compuestos inorgánicos desechados por las bacterias aerobias y facultativas, y aportan oxígeno al cuerpo de agua, el cual regresa a ser utilizado por las bacterias (Gray, 2004). Gray (2004) recomienda que los humedales artificiales para tratamiento de aguas tengan una profundidad menor a los 30 cm para que el agua influente haga contacto con el suelo y con la vegetación.

Entre más completo sea el sistema en cuanto a diversidad biológica, mejor será la depuración del agua (Seoáñez y Gutiérrez, 1999). La utilización de humedales artificiales, si se realiza adecuadamente, es una buena opción, ya que el costo de construcción y mantenimiento es muy bajo (Ran *et al.*, 2004). En algunos casos, el mantenimiento del humedal artificial solo consiste en realizar cosechas periódicas de las plantas (Bouda y Chien, 2005; Journey *et al.*, 1991; Oron, 1994; Ran *et al.*, 2004).

La implementación de humedales artificiales, es una práctica empírica y parece ser que el diseño no es crítico, siempre y cuando la superficie esté parcialmente sombreada y no haya gran movimiento del agua (Al-Nozaily *et al.*, 2000). Según Seoáñez y Gutiérrez (1999), la eficiencia de los humedales está entre 50 y 95% para

DBO (demanda biológica de oxígeno), entre 50 y 95% para sólidos en suspensión, entre 30 y 98% para nitrógeno y entre 20 y 90% para fósforo.

2.15.- Uso de *Lemna* spp. en biorreactores (lagunas de lemnáceas)

Una laguna de lemnáceas es un biorreactor de gran extensión donde se exponen plantas acuáticas de la familia Lemnaceae a los contaminantes del agua residual o tratada. El organismo expuesto tiene la función de depurar el agua al pasar a lo largo del biorreactor, lo que ocasiona que la calidad del agua mejore considerablemente y que posteriormente el efluente pueda ser reutilizado. Como ya se ha mencionado, las plantas lemnáceas poseen características asombrosas, por lo que la lentejilla de agua es una buena opción para utilizarla en biorreactores o humedales artificiales canalizados al tratamiento de aguas residuales. Olguín *et al.* (2000) y Ran *et al.* (2004) mencionan algunas ventajas de estas plantas al ser utilizadas en sistemas de depuración de aguas:

1. Disminuyen la evaporación si hay una cubierta total del agua por las plantas.
2. Reducen la cantidad de coliformes fecales.
3. Se alcanza la calidad adecuada del agua para riego en agricultura y suministro a ríos, especialmente por la remoción de materia orgánica y sólidos suspendidos.
4. Reducen la liberación de gases olorosos.
5. Soportan gran concentración de detergentes, los cuales poseen fosfatos entre otros compuestos.

Martínez *et al.* (2006) experimentaron con biorreactores de lemnáceas (*Lemna gibba*) para tratar agua de los canales de Xochimilco. Los resultados mostraron que los sistemas removieron materia orgánica (DQO), nutrientes como nitrógeno (N) y fósforo (P) y estabilizaron el pH. Por otra parte, Espinoza *et al.* (2002) analizaron lagunas de lemnáceas con y sin tratamiento anaerobio; encontraron que los dos sistemas fueron altamente eficientes y no mostraron diferencias significativas; sin embargo, la producción de biomasa vegetal fue mayor en la línea sin pretratamiento.

La intención de cualquier sistema de tratamiento de aguas, tanto de biorreactores como de humedales artificiales, es mejorar la calidad del agua para darle otro uso o para incorporarla a otros sistemas acuáticos sin contaminarlos (Ran *et al.*, 2004).

2.16.- Justificación

Actualmente la fitorremediación es un área emergente, especialmente en México, por lo que se requiere de investigación multidisciplinaria, desde botánica hasta ingeniería genética (Garbisu y Alkorta, 2001). Es por esto que el presente trabajo pretende brindar un acercamiento a la utilización de *Lemna gibba* en el tratamiento de agua. Con esta intención se buscó analizar algunas variables para estandarizar su cultivo y conocer un poco más acerca de la absorción de fosfatos y compuestos nitrogenados. La necesidad primordial para retirar estos compuestos del agua se debe a que a altas concentraciones pueden causar eutrofización en cuerpos de agua y efectos dañinos a la salud humana y animal (Ran *et al.*, 2004).

Dado que una de las fuentes de eutrofización son las descargas de aguas tratadas ricas en compuestos nitrogenados y fosfatados, es necesario que las plantas de tratamiento cuenten con procesos secundarios o terciarios según sea el caso, para eliminar estos compuestos. Asimismo, la investigación se enfoca en conocer y brindar un acercamiento sobre las propiedades de plantas flotantes del género *Lemna* para enfatizar su posible uso para la bioabsorción de estos compuestos.

3.- Objetivos

3.1.- Objetivo general

- Optimizar el uso de plantas del género *Lemna* para la absorción de compuestos nitrogenados y fosfatos en agua.

3.2.- Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones de cultivo de *Lemna gibba*.
- Establecer el cultivo axénico de *L. gibba*.
- Estandarizar el método analítico para cuantificar compuestos con nitrógeno y fósforo del agua.
- Optimizar las condiciones de bioabsorción de compuestos nitrogenados y fosfatos por *L. gibba* en el agua.
- Determinar la eficiencia de remoción de cada compuesto ante diferentes relaciones y concentraciones de nitrógeno y fósforo.

4.- Métodos

La estrategia metodológica que se siguió a lo largo de esta investigación se esquematiza en la Figura 6, la cual consistió en establecer el estado del arte para determinar tanto el sitio de colecta como los medios de cultivo utilizados en otros trabajos y los métodos analíticos a utilizar para la determinación de los compuestos en el agua. Para establecer las condiciones de cultivo se experimentó la variación de factores como pH, condiciones de iluminación y cantidad de inóculo, así como los medios de cultivo para mantener el material vivo. Posteriormente se realizaron los experimentos para determinar la bioabsorción de la planta con su respectivo análisis.

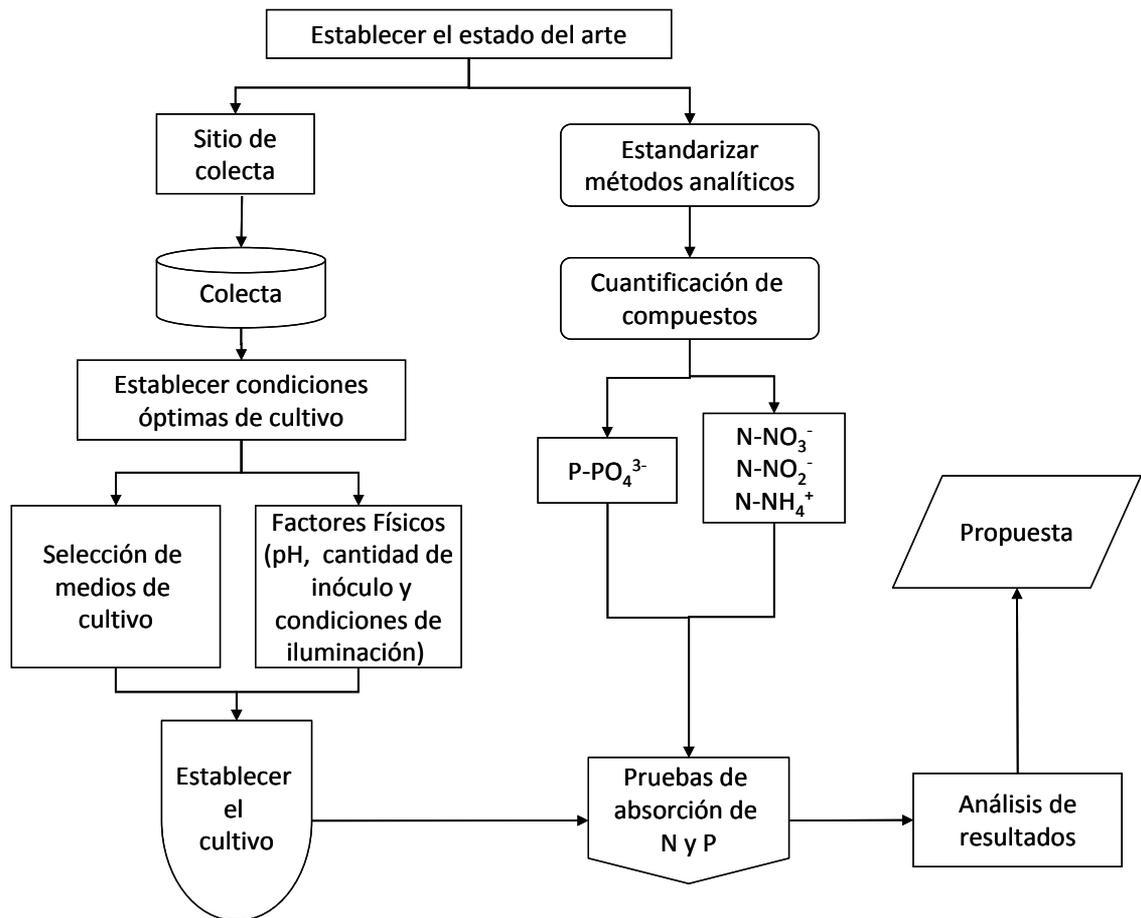


Figura 6. Diagrama de flujo de la estrategia metodológica.

4.1.- Material biológico

Se recolectaron 100 individuos de *Lemna gibba* en febrero de 2008. El sitio de colecta fue el Jardín Botánico del Instituto de Biología en la UNAM, ubicado al sur del Distrito Federal, México. La identificación de la planta se realizó con la asesoría de la M. en C. Martha Virginia Olvera García y el M. en C. Pedro Ramírez García en el Instituto de Biología de la UNAM. Las plantas se mantuvieron en peceras de 30x30 cm para aclimatarlas. La temperatura de sitio de cultivo se mantuvo alrededor de los 25 ± 2 °C en primavera y verano, y en 22 ± 3 °C en otoño e invierno; con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. A lo largo de los experimentos se utilizaron focos fluorescentes Aquarelle TDL de 30 W marca Phillips, con un flujo luminoso de 1820 Lm.

4.2.- Optimización de las condiciones de cultivo

4.2.1.-Medios de cultivo

Para seleccionar los medios de cultivo, se obtuvieron los medios utilizados para lemnáceas a partir de la literatura y se compararon en cuanto a compuestos y concentración. De acuerdo a lo anterior, se dividieron en dos grupos y de cada uno de ellos se seleccionó el más utilizado. Se seleccionaron Hoagland y Steinberg por ser los medios más citados y por ser altamente diferentes entre ellos. Se realizaron dos experimentos, inicialmente se compararon los medios entre sí para seleccionar el medio idóneo y en segundo lugar se experimentó para obtener la concentración óptima del mejor medio.

4.2.1.1.- Desarrollo de *Lemna gibba* ante Hoagland y Steinberg

Se efectuó la comparación de crecimiento de *L. gibba* ante los medios de cultivo Hoagland y Steinberg al 100% de concentración. Se realizaron nueve repeticiones por tratamiento en recipientes de plástico transparente de 250 ml en los cuales se vertieron 225 ml de medio. Con este volumen se obtuvo una profundidad de 6.5 cm. La duración del experimento fue de 11 días, se mantuvo una temperatura de 24.5 ± 1 °C, el pH del medio fue de 5.5 ± 0.2 . Para compensar la evaporación, la profundidad fue ajustada con su respectivo medio cada tercer día. Antes de cada inoculación, las plantas fueron colocadas en un recipiente con agua destilada para facilitar la selección de los individuos, los cuales fueron remojados en agua de la llave y

posteriormente se lavaron con agua destilada dirigida con una pizeta para colocarlas finalmente en el recipiente con medio de cultivo.

4.2.1.2.- Desarrollo de *L. gibba* ante distintas concentraciones de Hoagland

Para conocer el desarrollo de *L. gibba* ante distintas concentraciones del medio de cultivo Hoagland, se realizaron 3 tratamientos (Hoagland al 100%, al 50% y al 25%) con cinco repeticiones cada uno. Se utilizaron recipientes de plástico transparente de 250 ml que contenían 225 ml de medio por tratamiento. Se mantuvo una profundidad de 6.5 cm. La duración del experimento fue de 18 días, se mantuvo una temperatura de 24.5 ± 1 °C, el pH del medio fue de 5.5 ± 0.2 . Para compensar la evaporación, la profundidad fue ajustada con su respectivo medio cada tercer día. Antes de cada inoculación, las plantas fueron colocadas en un recipiente con agua destilada para facilitar la selección de los individuos, los cuales fueron remojados en agua de la llave y posteriormente se lavaron con agua destilada dirigida con una pizeta para colocarlas finalmente en el recipiente con medio de cultivo.

4.2.2.- Evaluación del crecimiento

Para conocer el crecimiento de la planta en ambos experimentos, se cuantificaron las siguientes variables: número de individuos, número de frondas, número de individuos muertos, área cubierta y peso fresco-peso seco. A partir de ellas se determinó tanto el método más eficiente para cuantificar el crecimiento de *L. gibba*, así como el medio de cultivo más favorable para su crecimiento.

La cuantificación se realizó contando el número de individuos y frondas de acuerdo con Morales *et al.* (2006). En el conteo de frondas se consideraron solamente las frondas hijas que fueran perfectamente diferenciables de la fronda madre. Se cuantificó el número total de individuos muertos a lo largo de los experimentos. Los individuos muertos no fueron considerados en los conteos de individuos o frondas. El criterio para identificar las frondas muertas se basó en la observación de una coloración amarillenta, se separan de las frondas vigorosas y en la mayoría de los casos, pierden la raíz. El área cubierta fue determinada con ayuda de una cuadrícula colocada sobre el recipiente, donde cada cuadro medía 0.25 cm^2 (Figura 7). El valor

fue relacionado con el área total del recipiente para cuantificarlo en cm^2 y en porcentaje. El peso fresco se obtuvo de individuos sin humedad superficial (Morales *et al.*, 2006). Para determinar el peso seco, los individuos fueron secados al sol hasta que presentaron biomasa constante (Figura 8).



Figura 7. Método de muestro para obtener la superficie cubierta por *Lemna gibba*.



Figura 8. Desección de las plantas para obtener el peso seco.

4.2.2.1.- Análisis de datos

Se determinó la velocidad de crecimiento (V_c) a partir de la fase de crecimiento exponencial (Ecuación 1), donde “ x ” representa el tiempo (días) y “ y ” la variable (número de individuos, número de frondas, etc.); los superíndices ¹ y ² representan tiempos distintos.

$$V_c = \frac{y^2 - y^1}{x^2 - x^1} \quad (\text{ec. 1})$$

El tiempo de duplicación (td) se obtuvo a partir de la fórmula utilizada por Moretti y Gigliano (1988) (Ecuación 2), donde td es igual al tiempo de duplicación, t es la duración del experimento, Wt es el valor final de la variable y Wo es el valor inicial de la misma. Los resultados fueron analizados por medio de una prueba de ANOVA y *post-hoc* de Tukey con el paquete estadístico de GraphPad Prism versión 5 para Windows.

$$td = \frac{t * \log 2}{\log(Wt * Wo^{-1})} \quad (\text{ec. 2})$$

4.2.3.- Factores ambientales

Se realizaron tres experimentos para conocer los factores ambientales en los que el crecimiento de *L. gibba* fuera el óptimo, con tres repeticiones por tratamiento en cada experimento. En esta ocasión se utilizaron recipientes opacos de poliestireno (unicel) de 315 ml, en los cuales fue vertido un volumen de 250 ml de medio Hoagland al 25%. Los experimentos tuvieron una duración de 21 días, la temperatura a lo largo de los experimentos se mantuvo en 25 ± 1 °C.

4.2.3.1.- Cantidad de inóculo

Para determinar la cantidad de inóculo que permitiera un mejor desarrollo de *L. gibba* se varió la cantidad de planta colocada inicialmente, la cual fue de 1 cm^2 (2.4 %) a 17.7 cm^2 (42%) de cobertura. Se consideró el mismo número de individuos-frondas de la planta para cada repetición por tratamiento. El pH inicial de 5.5 ± 0.2 . La

variable se midió cualitativamente dependiendo de la vigorosidad de las frondas y por la presencia o ausencia de algas en el medio de cultivo.

4.2.3.2.- pH

Para conocer el pH óptimo al que *L. gibba* puede crecer sin ser afectada por algas, se realizó un experimento donde se modificó el pH en intervalos de unidad, el cual fue a partir de 3.5 hasta 8.5. El inóculo fue de 7 individuos por réplica (1 cm² de cobertura). La medición del pH se cuantificó por medio de tiras de papel indicador de pH marca colorpHast® cada siete días.

4.2.3.3.- Condiciones de iluminación

La iluminación del cultivo se llevó a cabo utilizando focos fluorescentes con un flujo luminoso de 1820 Lm. Se experimentó con dos tratamientos tomando en cuenta como variable la distancia al foco, a 60 cm se obtuvo una radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 21.55 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y a 25 cm 34.68 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; asimismo se consideró la capacidad de los recipientes para dejar pasar la luz (transparentes) o reflejarla (opacos). El pH inicial del experimento fue de 5.5 ± 0.2 y el inóculo fue 7 individuos por réplica (1 cm² de cobertura).

4.3.- Bioabsorción de compuestos nitrogenados y fosfato

Para la determinación de los compuestos nitrogenados y fosfato se utilizaron vasos de unicel de 250 ml que contenían 180 ml de medio Hoagland modificado al 25% y con la concentración correspondiente de nitratos y fosfatos por tratamiento (Cuadro 3). El medio de cultivo Hoagland modificado contó con nitrógeno en forma de KNO₃ y Ca(NO₃)₂ y con fósforo como KH₂PO₄ (Anexo A).

Se llevaron a cabo tres réplicas por tratamiento. Como inóculo inicial se agregó una cobertura de área del 40% aproximadamente por réplica. La temperatura se mantuvo en 22°C, el experimento tuvo una duración de ocho días. La respuesta se evaluó a los días 1, 3, 7 y 8 por medio de la concentración total de nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal y fosfato en el medio.

El crecimiento de la planta fue determinado por medio del área cubierta y de la biomasa producida; asimismo se cuantificó la concentración de clorofila a y b para conocer la respuesta fotosintética. Los resultados fueron analizados por medio de una prueba de ANOVA y pruebas *post-hoc* de Tukey y Bonferroni con el paquete estadístico de GraphPad Prism versión 5 para Windows.

La determinación indirecta de nitratos, nitritos y fosfato se realizó por métodos colorimétricos. En el caso de la determinación de nitrógeno amoniacal, se llevó a cabo una destilación y posterior titulación. Las determinaciones se realizaron según la metodología de Primo y Carrasco (1973) (Anexo B).

4.3.1.- Remoción de compuestos nitrogenados y fosfato

Para la determinación de los compuestos absorbidos se utilizaron distintas concentraciones y proporciones de N:P según el método utilizado por Al-Hamdani y Sirna (2008). Las proporciones utilizadas de N y P se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Proporción de N:P según el método de Al-Hamdani y Sirna (2008).

Tratamiento	N (mg/L)	P (mg/L)	N:P
1	1.0	0.1	10:1
2	10.0	1.0	10:1
3	100.0	0.1	1000:1
4	1.0	10.0	1:10
5	100.0	10.0	10:1

4.3.2.- Evaluación del crecimiento

El desarrollo de *L. gibba* se cuantificó por medio del área cubierta y de la biomasa producida por medio de la determinación del peso fresco y peso seco utilizando el método referido con anterioridad.

4.3.3.- Determinación de clorofila

El contenido de clorofila a y b fue determinado por espectrofotometría según el método utilizado por Yu y Gu (2007) (Anexo C).

5.- Resultados y Discusión

5.1.- Optimización de las condiciones de cultivo

5.1.1.- Medios de cultivo

Se encontró una gran variedad de medios nutritivos reportados en la literatura para el cultivo en laboratorio de lemnáceas, los cuales fueron: medio Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950; Miranda, 1998), Steinberg (Clatworthy y Harper, 1962), Steinberg modificado por Altenburguer (OECD, 2006), Huttner 1/10 (Körner et al., 2003), Jacob (Bowers-Irons, 1992), SIS (OECD, 2006) y 20X AAP (OECD, 2006). Para elegir los medios a probar, se comparó la composición de los diferentes medios y se seleccionaron Steinberg modificado por Altenburguer (OECD, 2006) y Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950; Miranda, 1998). Para conocer el desarrollo de la lemnácea en ellos se realizaron dos experimentos. En primer lugar se expuso a *Lemna gibba* a ambos medios y posteriormente fue probada en distintas concentraciones de Hoagland (100%, 50% y 25%), ya que el uso de diluciones de éste era reportado frecuentemente en la literatura.

5.1.1.1.- Desarrollo de *Lemna gibba* ante Hoagland y Steinberg

Las plantas de *L. gibba* se desarrollaron en ambos medios probados, sin embargo se encontraron diferencias importantes. Las plantas en el medio Hoagland presentaron un mejor desarrollo, las frondas mostraron mayor vigor y mejor coloración, es decir que presentaron un color verde brillante, mientras que las de Steinberg presentaron un color amarillo o verde pálido (Figura 9).

El mayor número de individuos muertos totales se registró en Steinberg, los cuales aparecieron a partir del séptimo día, mientras que ante Hoagland a partir del onceavo día. Con base en lo anterior se obtuvo que en Steinberg murió en promedio un individuo cada día, mientras que ante el medio Hoagland uno cada 5.5 días. Uno de los mayores problemas que presentó el medio Steinberg fue la gran contaminación de algas en todas las repeticiones.

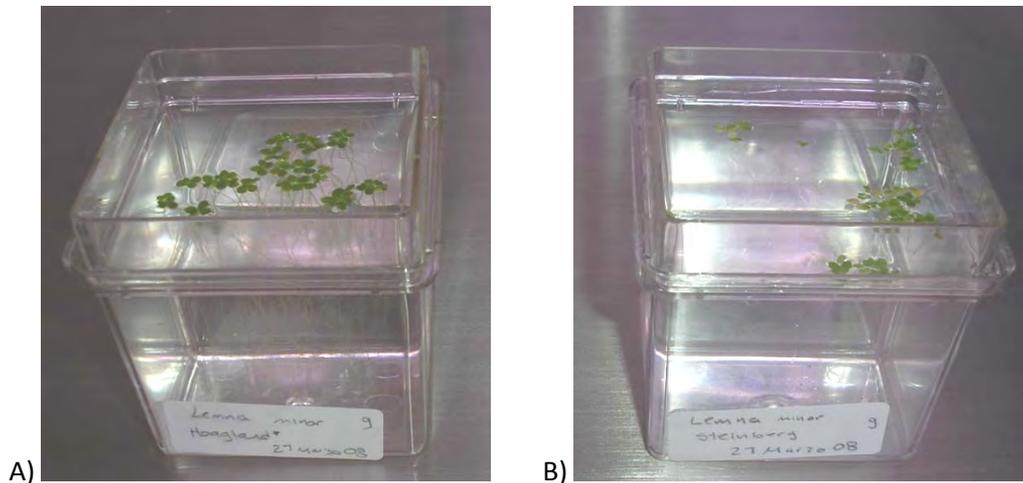


Figura 9. *Lemna gibba* en distintos medios de cultivo. A) Hoagland. B) Steinberg.

Con base en las características de desarrollo de la planta se determinó que Hoagland, aparte de contar en general con menor requerimiento en cuanto a los compuestos que lo componen, presentó las plantas más vigorosas, lo cual lo hace ser un medio más adecuado para el creamiento de *L. gibba*.

5.1.1.2.- Desarrollo de *L. gibba* ante distintas concentraciones de Hoagland

La evaluación del crecimiento de *L. gibba* ante el medio de cultivo Hoagland al 100%, 50% y 25% fue determinado por medio de la cualificación de individuos, frondas, individuos muertos, área cubierta y la producción de biomasa por el peso fresco-peso seco de las plantas.

5.1.2.- Evaluación del crecimiento

5.1.2.1.- Número de individuos

Lemna gibba se desarrolló adecuadamente ante Hoagland a 100%, 50% y 25%, en ninguno de los tratamientos probados se presentó etapa de decaimiento dado que eran sistemas alimentados constantemente con medio nutritivo para compensar la evaporación, por lo que no hubo estrés ante falta de nutrientes. Por otra parte, el crecimiento del cultivo no se vio afectado por que una vez cubierto el 100% del área del recipiente por la planta, los individuos podían crecer unos sobre otros. En la Figura 10 se puede observar que la fase exponencial estaba dando inicio en los

últimos días del experimento, donde se observa que el mayor número de individuos se encontró en Hoagland al 25%.

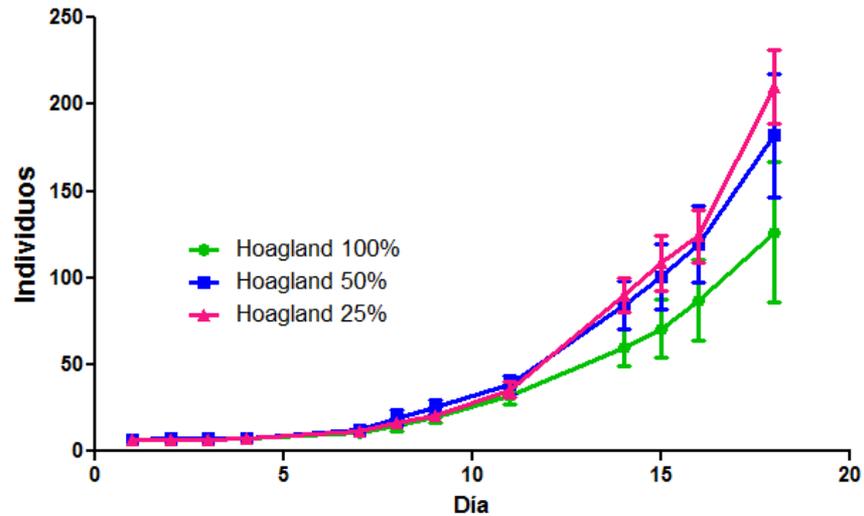


Figura 10. Número de individuos por medio de cultivo.

La mayor velocidad de crecimiento en cuanto a individuos por día fue obtenido asimismo en el medio Hoagland al 25%, seguido por el medio Hoagland al 50%. El medio con menor velocidad de crecimiento fue Hoagland al 100%. Este fenómeno se observó en la mayoría de las variables medidas. Tanto el menor tiempo de duplicación (3.67 individuos por día) como la mayor velocidad de crecimiento de *Lemna gibba* (42.9 días) se obtuvo en el medio Hoagland 25% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Velocidad de crecimiento (Vc) y tiempo de duplicación (td) para el número de individuos en cada medio de cultivo.

Medio de Cultivo	Vc (individuos por día)	td (días)
Hoagland 100%	19.6	4.3
Hoagland 50%	31.3	3.8
Hoagland 25%	42.9	3.7

Al concluir el experimento, se calculó un análisis de varianza para conocer que los medios de cultivo diferenciaban significativamente ($P < 0.05$) entre sí en cuanto al número de individuos (Cuadro 5). Según la prueba de Tukey realizada, se demostró que Hoagland al 100% y 50% no son distintos, al igual que Hoagland al 50% y 25%. A pesar de esto, se pudo observar que la varianza es mucho menor en los resultados de Hoagland al 25%. Los tratamientos de Hoagland al 100% y 25% son significativamente diferentes (Figura 11).

Cuadro 5. Anova para el número de individuos entre medios de cultivo.

ANOVA para No. de Individuos por Medio	
Valor de P	0.0019
Resultado significativo ($P < 0.05$)	Si
F	9.211
R^2	0.6972

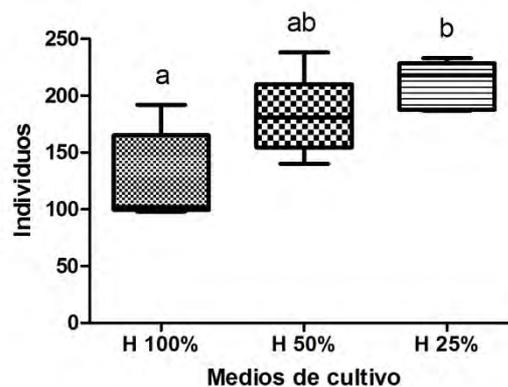


Figura 11. Prueba Tukey para el número de individuos al último día en cada medio de cultivo (letras distintas se refieren a diferencias significativas entre tratamientos).

La cuantificación del número de individuos no resultó ser una opción adecuada para la evaluación del crecimiento porque cuando las plantas presentan estrés, tienden a formar más individuos de una sola fronda, que con el tiempo pierden su vigorosidad y posteriormente mueren.

5.1.2.2.- Número de frondas

Al considerar el número de frondas, la mejor respuesta se obtuvo en Hoagland al 25% y el menor en Hoagland al 100%. Como fue observado y comentado anteriormente, no se alcanzó la asíntota de crecimiento (Figura 12). Los individuos vigorosos contaban por lo general con 4 frondas por individuo, como bien menciona Arroyave (2004); sin embargo, el número máximo observado en un solo individuo fue de 16 frondas.

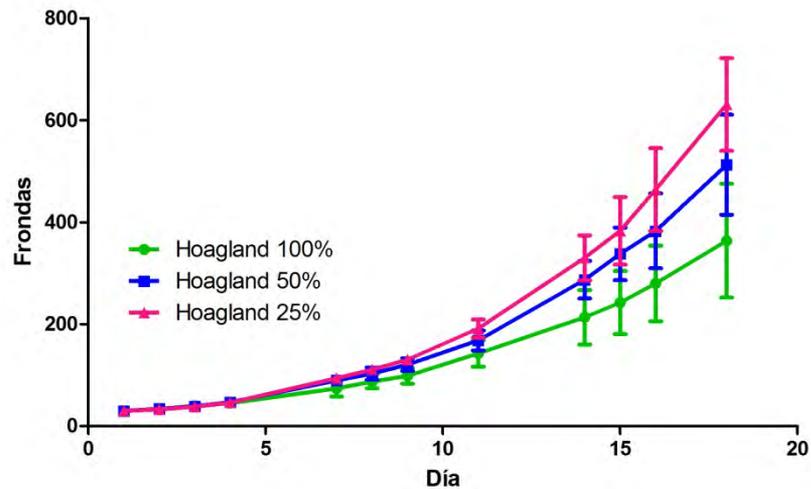


Figura 12. Número de frondas por medio de cultivo.

La mayor velocidad de crecimiento y el menor tiempo de duplicación se obtuvieron de nuevo en Hoagland al 25% con 83.5 frondas por día y 4.1 días respectivamente (Cuadro 6). Al realizar la prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Tukey se determinó una vez más que Hoagland al 25% es distinto a Hoagland al 100% (Cuadro 7 y Figura 13).

Cuadro 6. Velocidad de crecimiento (Vc) y tiempo de duplicación (td) para el número de frondas por medio.

Medio de Cultivo	Vc (frondas por día)	td (días)
Hoagland 100%	42.1	5.0
Hoagland 50%	65.1	4.4
Hoagland 25%	83.5	4.1

Cuadro 7. Anova para el número de frondas por medio de cultivo.

ANOVA para el no. de frondas	
Valor de P	0.0011
Resultado significativo (P < 0.05)	Si
F	10.67
R ²	0.7273

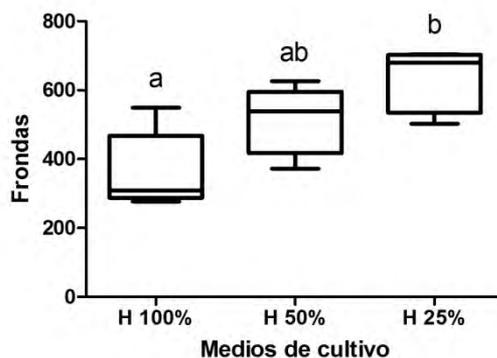


Figura 13. Prueba Tukey para el número de frondas por cada medio de cultivo (letras distintas se refieren a diferencias significativas entre tratamientos).

El cuantificar el número de frondas brindó valores más precisos que el número de individuos, ya que como se comentó anteriormente, ante estrés se separan las frondas y parece ser que en este caso el número de frondas no se modifica ante estrés. Es probable que bajo estas condiciones, el tiempo en que surja una fronda hija se prolongue, mostrando que está bajo estrés. Sin embargo, la obtención de este parámetro implica perder simplicidad en la toma de medición.

5.1.2.3.- Número total de individuos muertos

El mayor número de individuos muertos se presentó en el medio Hoagland al 100%, seguido por Hoagland al 50% y la menor cantidad de éstos se obtuvo ante Hoagland al 25% (Figura 14). Esto significa que, tomando en cuenta el número total de individuos tanto vigorosos como muertos a lo largo del experimento, ante Hoagland

al 100% murió en promedio el 10.9% de los individuos, mientras que ante Hoagland al 25% solamente murió el 2.8% de la población.

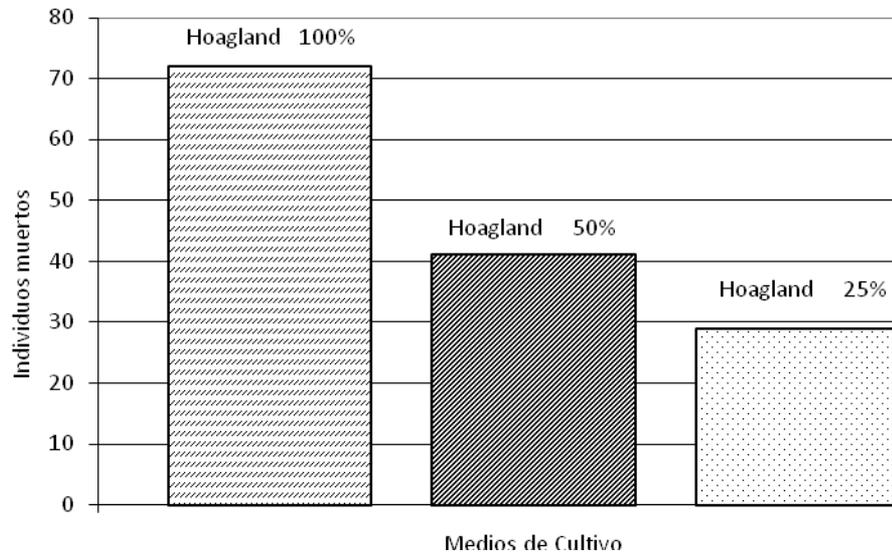


Figura 14. Número total de individuos muertos en cada uno de los medios de cultivo.

La cuantificación del número total de individuos muertos da una idea sobre la frecuencia de mortandad que se obtuvo en cada uno de los medios. El obtener este dato ayudó en gran medida al decidir el medio nutritivo a utilizar posteriormente.

5.1.2.4.- Área cubierta

El área cubierta por *Lemna gibba* se desarrolló de manera distinta entre los medios (Figura 15). Las mayores coberturas se obtuvieron con Hoagland al 25% y al 50%, los cuales alcanzaron un porcentaje de cobertura final del 94% y 95% respectivamente. La prueba de ANOVA mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) (Cuadro 8) y la prueba de Tukey denotó que no difieren significativamente Hoagland al 50% y 25%, pero ambos son diferentes a Hoagland al 100% (Figura 16).

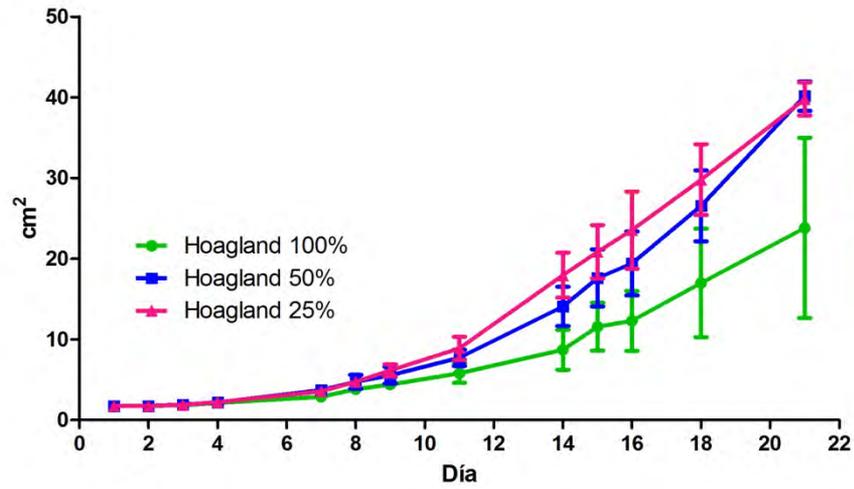


Figura 15. Área cubierta en cm² en cada medio de cultivo.

Cuadro 8. Anova para el área cubierta en cada medio de cultivo.

ANOVA para el área cubierta por medio	
Valor de P	0.0016
Resultado significativo (P < 0.05)	Si
F	9.630
R ²	0.7065

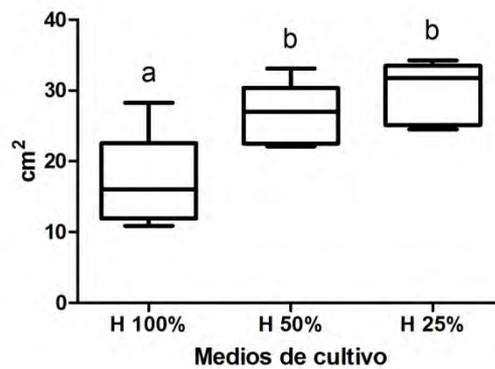


Figura 16. Prueba de Tukey para el área cubierta en cada medio de cultivo (letras distintas se refieren a diferencias significativas entre tratamientos).

A pesar de que no son significativamente diferentes Hoagland al 50% y 25%, la determinación de la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación indicaron que con Hoagland al 50% se obtuvieron los mejores resultados (10.7 mm² de aumento en la cobertura por día y 4.59 días para la duplicación de la población), seguido por Hoagland al 25% (Cuadro 9).

Cuadro 9. Velocidad de crecimiento (Vc) y tiempo de duplicación (td) para el área cubierta por medio.

Medio de Cultivo	Vc (mm ² por día)	td (días)
Hoagland 100%	5.3	5.6
Hoagland 50%	10.7	4.6
Hoagland 25%	7.8	4.7

El área cubierta es una buena opción para cuantificar el crecimiento de lemnáceas, ya que fue el método más sencillo en comparación con el conteo de individuos y frondas. La medición de esta variable permite percibir el estrés dado que las frondas son más pequeñas, mientras que al mantener una buena concentración de nutrientes y condiciones adecuadas, los individuos aumentan en número de frondas, lo que se ve reflejado en un incremento en el tamaño de los individuos y consecuentemente en el área cubierta por la planta.

5.1.2.5.- **Peso fresco y peso seco final**

La diferencia entre el peso fresco y peso seco entre los tratamientos mostró una vez más que los menores valores se obtuvieron en las plantas expuestas a Hoagland al 100% y ante Hoagland al 50% y al 25% se tuvieron los mayores resultados (Figura 17). El análisis de ANOVA y Tukey mostraron que no hubo diferencia en el peso seco de *L. gibba* ante Hoagland al 50% y 25%, mientras que Hoagland al 100% diferenciaba de ambos (Cuadro 10 y Figura 18).

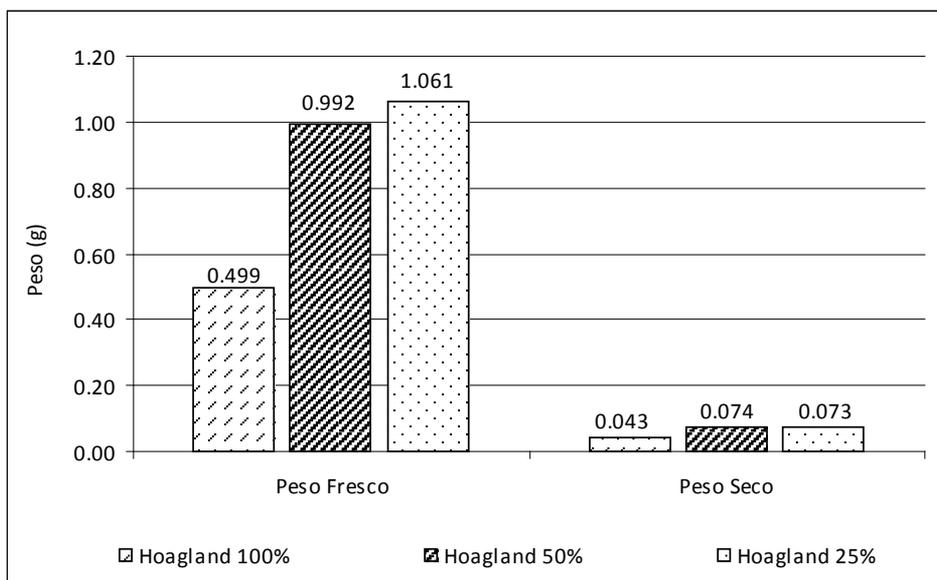


Figura 17. Comparación del peso fresco y peso seco por cada tratamiento.

Cuadro 10. Anova para el peso seco en cada medio de cultivo.

ANOVA para el área cubierta por medio	
Valor de P	0.0033
Resultado significativo (P < 0.05)	Si
F	8.041
R ²	0.6678

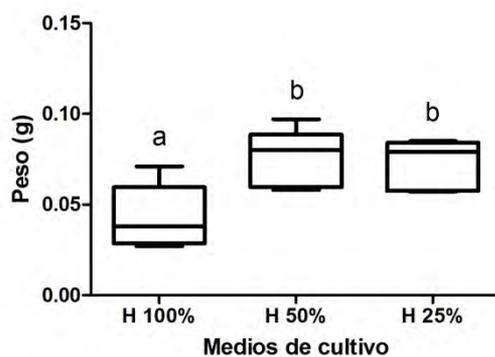


Figura 18. Prueba Tukey para el peso seco en cada medio de cultivo (letras distintas se refieren a diferencias significativas entre tratamientos).

El análisis de varianza solamente se determinó para el peso seco dado que éste equivale a la cantidad de biomasa vegetal (peso sin la proporción de agua) que se produjo a lo largo del experimento en cada uno de los medios. El aumento de biomasa es indicativo de un buen desarrollo de la planta, la cual asimismo, puede ser utilizada para otros fines, como alimento para aves o peces, razón por la cual tiene mayor importancia que el peso fresco en esta determinación en específico.

Con base en los resultados obtenidos al comparar las variables mencionadas en los distintos medios de cultivo, se seleccionó trabajar posteriormente con Hoagland al 25% por las siguientes razones:

- a) En comparación con el medio Steinberg, cualitativamente las frondas ante Hoagland mostraron un mayor vigor, observado como la coloración verde brillante de las frondas.
- b) A pesar de que se pueden realizar experimentos con concentraciones distintas de Steinberg que posiblemente den mejores resultados que Steinberg al 100%, este requiere de un gran número y concentración de compuestos para su preparación, por lo que en términos de presupuesto la mejor opción es utilizar Hoagland.
- c) Hoagland al 50% no presentó diferencias significativas respecto a Hoagland al 25%, pero las observaciones en el tiempo de duplicación y velocidad de crecimiento en algunos parámetros fueron superiores, lo que favorece la selección por el medio Hoagland al 25%.
- d) Hoagland al 25% obtuvo la menor cantidad de individuos muertos a lo largo del cultivo de *L. gibba*.
- e) En cuanto a la concentración de compuestos requeridos para la elaboración de Hoagland al 25% es menor que cualquiera de los otros medios, por lo que desde el punto de vista económico es una buena opción para su preparación a grande escala.

5.1.3.- Factores ambientales

Para contrarrestar el crecimiento acelerado de algas que competían con *L. gibba* en el medio, se variaron algunas condiciones que podrían favorecer a la macrófita

durante el periodo de cultivo. Las variantes al cultivo de *L. gibba* en Hoagland al 25% fueron: variación en la cantidad de inóculo, pruebas a distinto pH y diferentes condiciones de iluminación.

5.1.3.1.- Cantidad de inóculo

La cantidad de planta (individuos-frondas) considerada como inóculo varió en los experimentos de 1 cm² (2.4 %) a 17.7 cm² (42%) de cobertura. El menor inóculo representó una cantidad de 7±1 individuos (30±1 frondas) por réplica y el mayor, calculado por extensión, fue de aproximadamente 124 individuos (532 frondas).

Se observó que entre mayor sea la cantidad del inóculo, mejor será el desarrollo de la planta, ya que la luz captada por la superficie del recipiente fue absorbido por las macrófitas flotantes y no penetraba al medio, esto bloqueó la luz que pudiera llegar a las algas y por lo tanto provocó que su crecimiento en el medio no fuera explosivo.

Es importante mencionar que, como se indica anteriormente, las lemnáceas cuentan con una íntima relación con algas que se encuentran adheridas a su raíz, por lo que la presencia de éstas en el medio es casi inevitable, pero controlable.

5.1.3.2.- pH

El crecimiento de *Lemna gibba* ante los distintos pH no presentó diferencias significativas a excepción del tratamiento con pH de 3.5 (Figura 19). En este tratamiento se exhibió el menor crecimiento tanto de algas como de las macrófitas y éstas presentaron una coloración amarillenta en todas las réplicas. Las frondas vigorosas fueron observadas mayoritariamente en un pH entre 4.5 y 5.5 (Cuadro 11).

Es importante mencionar que a pesar de no haber diferencia significativa en los tratamientos de pH entre 3.5 y 8.5, el menor tiempo de duplicación (14.42 días) y mayor velocidad de crecimiento (10.7 mm²/d) se obtuvo a pH 4.5 seguido por los obtenidos a pH de 5.5 (Cuadro 12).

Cuadro 11. Porcentaje de área cubierta, frondas cloróticas, medición cualitativa del vigor de las frondas, presencia de algas y peso fresco y seco ante la variación de los factores ambientales para el cultivo de *L. gibba*.

	Área cubierta (%)				Frondas amarillas (%)							Vigor cualitativo de las frondas						Presencia cualitativa de algas							Peso Fresco (g)		Peso Seco (g)		
	Día				Día							Día						Día							Día		Día		
	0	13	19	21	0	5	7	11	12	13	21	5	7	11	12	13	21	0	5	7	11	12	13	21	0	21	0	21	
pH 3.5																													
21.55 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	42	94	100	100	0	60	70	70	70	50	75	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	0.43	0.61	0.05	0.05	
34.68 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	42	99	100	100	0	60	60	60	50	40	25	+	+	+	++	++	++	-	-	-	-	-	+	++	0.43	1.01	0.05	0.08	
pH 4.5																													
21.55 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	42	89	100	100	0	10	5	5	5	5	10	++	+++	+++	+++	+++	++++	-	-	-	+	++	++	++	0.43	0.79	0.05	0.05	
34.68 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	42	99	100	100	0	10	10	10	5	5	10	++	+	+	+	++	+++	-	-	+	+	+	++	+++	0.43	1.02	0.05	0.07	
pH 5.5																													
21.55 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	42	97	99	100	0	5	5	5	5	5	10	+++	+++	+++	+++	+++	++++	-	-	-	+	++	++	++	0.43	0.90	0.05	0.07	
34.68 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	42	98	100	100	0	5	5	5	5	5	10	+++	+	+	+	++	+++	-	-	+	+	+	++	+++	0.43	1.26	0.05	0.08	

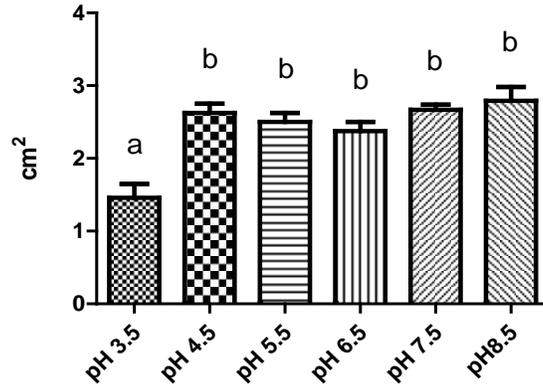


Figura 19. Área cubierta ante distinto pH y significancia ($P < 0.05$) según la prueba de Tukey para el crecimiento de *Lemna gibba* al último día (letras distintas se refieren a diferencias significativas entre tratamientos).

Cuadro 12. Velocidad de crecimiento (Vc) y tiempo de duplicación (td) de *L. gibba* ante distinto pH.

pH	Vc (mm ² por día)	td (días)
3.5	0.6	167.4
4.5	10.7	14.4
5.5	8.9	16.9
6.5	6.6	22.6
7.5	6.6	25.7
8.5	7.1	24.6

A pesar de que los tratamientos con pH 3.5 fueron los que presentaron menor crecimiento, se observó que el pH aumentó a 5.5 al día 7. Esto explicaría el crecimiento comparable con los demás tratamientos al día 13 (Cuadro 11). El fenómeno del aumento de pH también se presentó en el experimento donde, a pesar de que inicialmente el pH era de 5.5 ± 0.2 , al final de ese experimento (día 11) aumentó a 6 y 6.5 en los tratamientos con *L. gibba* ante Hoagland y Steinberg. Morales *et al.* (2006) y Zhen-Gang (2008) mencionan que las algas asociadas a *Lemna* spp. juegan un

papel principal en la alcalinización del medio. Gracias a este aumento en el pH, *Lemna gibba* pudo recuperarse ante el pH más ácido.

Para determinar el crecimiento alcanzado por las plantas al final del experimento, se determinó el peso fresco y peso seco de *L. gibba* para cada uno de los tratamientos con variación de pH, en los cuales se observó que el mayor peso fresco final se obtuvo a pH 5.5 (Cuadro 11).

En la literatura consultada el medio Hoagland cuenta con un pH de 5.5 +/- 0.2 y a pesar de que no se presentaron diferencias significativas en el crecimiento, a este pH se obtuvo el mayor peso fresco y seco, por lo que se mantuvo este pH en los siguientes experimentos.

5.1.3.3.- Condiciones de iluminación

Las frondas vigorosas fueron observadas mayoritariamente a una radiación de 21.55 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Cuadro 11). Para el caso de la contaminación por algas, se observó que se redujo comparativamente el crecimiento de algas de este experimento con los anteriores. La contaminación inició al día 11 en general y se mantuvo relativamente baja y estable hasta el final del experimento (día 21), con un menor grado de contaminación ante 21.55 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ al último día. Con base en los resultados obtenidos, se afirma que ante esta radiación el cultivo de *L. gibba* fue más favorable. A pesar de que esta radiación es menor a las reportadas en la literatura, es importante considerar que se redujo la contaminación por algas para los siguientes experimentos.

Por otra parte, de los tipos de recipientes utilizados en los experimentos para el cultivo de la planta (plástico transparente y unicel), se observó que el crecimiento de algas fue mayor en los recipientes que dejaban pasar la luz. Sin embargo, para futuras referencias de cultivo se recomienda el uso de recipientes de plástico opacos y de preferencia de color oscuro, para evitar que la luz sea reflejada y permanezca dentro al penetrar en el recipiente.

5.2.- Bioabsorción de compuestos nitrogenados y fosfato

Las concentraciones de nitrógeno y fósforo utilizadas (Cuadro 3) representan un rango de posibilidades que se encuentran tanto en la naturaleza como en agua residual que ingresa a plantas de tratamiento (Al-Hamdani y Sirna, 2008). Para el Tratamiento 1 se utilizaron las concentraciones normales en un cuerpo de agua dulce estable; en el caso del Tratamiento 2 se simuló concentraciones de nitrógeno y fósforo en un cuerpo de agua eutrófico; y el Tratamiento 3 tuvo las concentraciones que puede poseer el influente de plantas de tratamiento de agua. En los demás tratamientos se manipularon las concentraciones de nitrógeno ante una alta concentración de fósforo en el medio; el Tratamiento 4 contó con una concentración normal de nitrógeno; mientras que en el Tratamiento 5, el nitrógeno se encontró en concentraciones de eutrofización (Cuadro 3). A continuación se describen los resultados obtenidos de remoción de los compuestos en cada uno de los cinco tratamientos, subsecuentemente se describen los resultados obtenidos sobre la evaluación del crecimiento y posteriormente de la concentración de clorofila a y b.

5.2.1.- Remoción de compuestos nitrogenados y fosfato por tratamiento

Los cinco tratamientos descritos a continuación tratan de explicar lo sucedido ante las diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos analizados.

5.2.1.1.- Tratamiento 1

El Tratamiento 1, con concentraciones de 1.0 mg/L de nitrógeno y 0.1 mg/L de fósforo, fue el tratamiento de referencia al contener concentraciones normales en un cuerpo de agua estable (Al-Hamdani y Sirna, 2008). En el caso del nitrógeno en forma de NH_4^+ , a pesar de tener altas concentraciones iniciales no esperadas (probablemente por el pH de 5.5 inicial o por un error de medición), fue removido en un 46% al primer día. Al término del experimento, el NH_4^+ fue removido en un 51% (Figura 20). El comportamiento del nitrógeno en forma de NO_3^- a lo largo de los ocho días de medición fue irregular, a partir de la concentración inicial, aumentó al día 7 y para el día 8 disminuyó (Figura 21). La remoción de fósforo al tercer día fue del 73%, a partir del cual la concentración se mantuvo constante (Figura 21).

El aumento del NO_3^- probablemente se debió a que parte del NH_4^+ se pudo oxidar. Este fenómeno es común a lo largo del ciclo del nitrógeno. A pesar de esto, la suma del nitrógeno tanto en forma de NO_3^- como en NH_4^+ , disminuyó en un 49% al final del experimento.

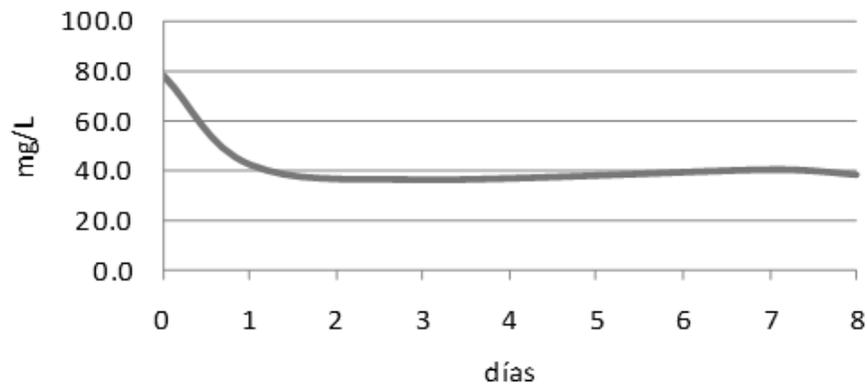


Figura 20. Seguimiento de la remoción de N-NH_4^+ en el Tratamiento 1.

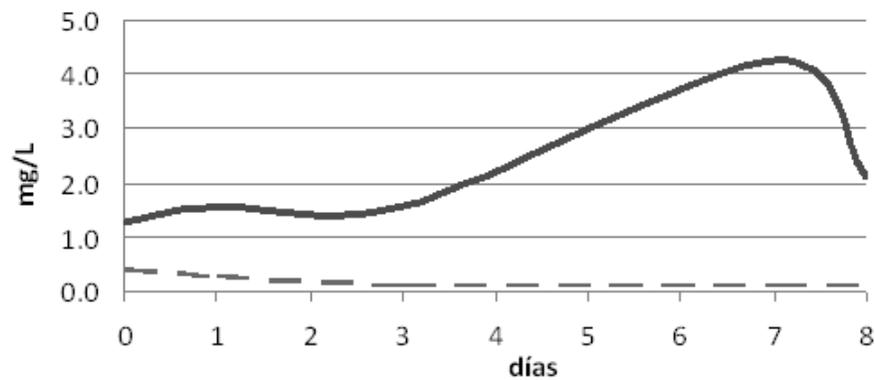


Figura 21. Seguimiento de la remoción de P-PO_4^{3-} (línea punteada) y N-NO_3^- (línea continua) del Tratamiento 1.

5.2.1.2.- Tratamiento 2

El Tratamiento 2 simula concentraciones de nitrógeno y fósforo en un cuerpo de agua eutrófico (Al-Hamdani y Sirna, 2008). Los datos indican que la remoción de NH_4^+ se dio al primer día en un 62%, alcanzando un 73% de remoción al octavo día (Figura 22). La remoción de NO_3^- al primer día fue del 38%, alcanzando un 63% de remoción al séptimo día (Figura 23). El comportamiento del nitrógeno fue irregular dado que se

observaron fluctuaciones de NH_4^+ y NO_3^- , muy probablemente porque en el sistema hayan habido bacterias participantes en el ciclo del nitrógeno y pudieron transformar parte del NH_4^+ en NO_3^- . A pesar de esto, se observó que el nitrógeno (N-NH_4^+ y N-NO_3^-) final disminuyó en un 72% a comparación del inicial.

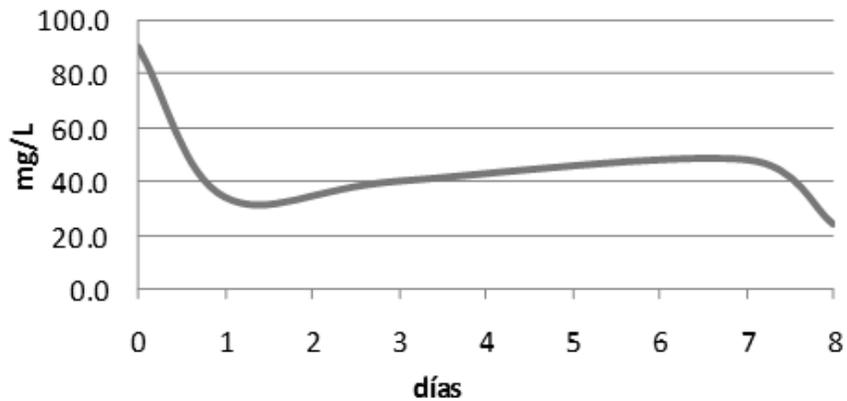


Figura 22. Seguimiento de la remoción de N-NH_4^+ en el Tratamiento 2.

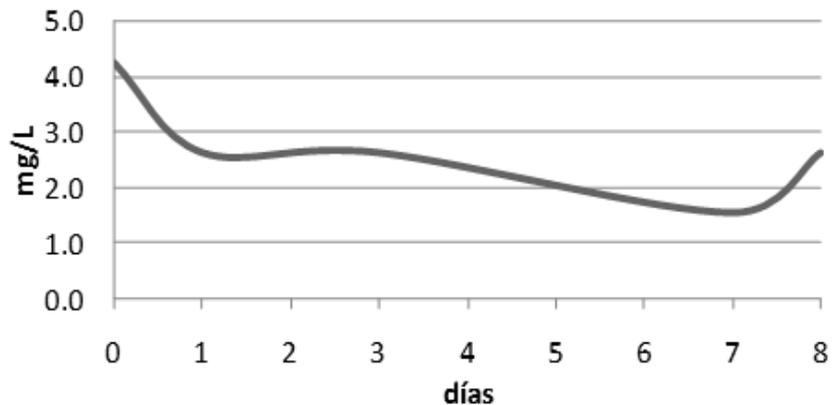


Figura 23. Seguimiento de la remoción de N-NO_3^- en el Tratamiento 2.

En cuanto al fósforo la remoción se dio abruptamente al tercer día, es decir que se eliminó un 51% y continuó más lentamente hasta el día ocho, donde se removi6 un 76% del f6sforo inicial (Figura 24).

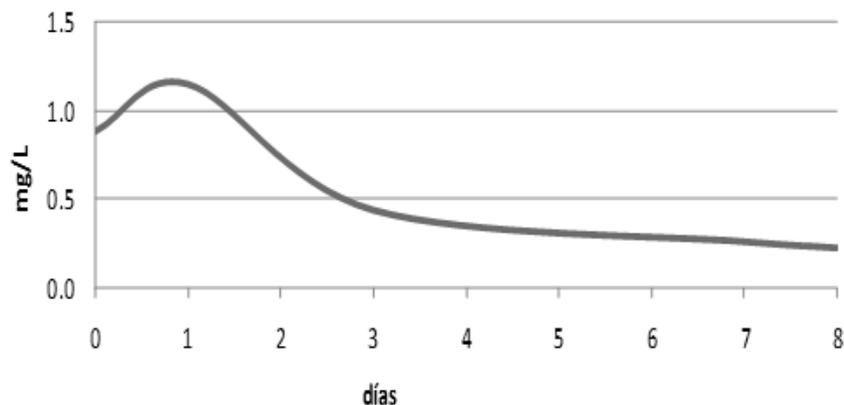


Figura 24. Seguimiento de la remoción de P- PO₄³⁻ en el Tratamiento 2.

5.2.1.3.- Tratamiento 3

A pesar de que la concentración inicial de nitrógeno fue muy elevada (100 mg/L), el NH₄⁺ fue removido en un 65% al primer día; posteriormente incrementó un poco y luego disminuyó al octavo día a un 79%. En cuanto al N- NO₃⁻, el porcentaje de remoción final fue poco (21%), pero si se compara con los otros tratamientos es alto dado que se removieron 10.2 mg de N- NO₃⁻ (Figura 25); este valor representó la mayor disminución de N- NO₃⁻ en todos los tratamientos.

La alta concentración de NH₄⁺ (tanto en éste como en los demás tratamientos) pudo deberse a que el medio de cultivo contaba con un pH inicial de 5.5, ante un medio ácido, se favorece la reducción de los compuestos, en este caso de NO₃⁻ a NH₄⁺. Conforme el pH se va neutralizando y por la misma absorción y posible oxigenación de la planta, el NH₄⁺ disminuye mientras que el NO₃⁻ aumenta. Esto no explica la extremadamente elevada medición de NO₃⁻ al día 3, lo cual pudo ser un error de medición, pero da solución al aumento de NO₃⁻ inicial. A pesar de la compleja dinámica del nitrógeno en el sistema, se observó que al día ocho ambos compuestos disminuyeron considerablemente a comparación de su concentración inicial, el cual se representó como un 60% de remoción de nitrógeno (N-NH₄⁺ y N-NO₃⁻).

La disminución del fósforo al tercer día fue abrupta (77% de remoción), a partir del cual se mantuvo constante la concentración hasta que al octavo día se removió por completo (Figura 26).

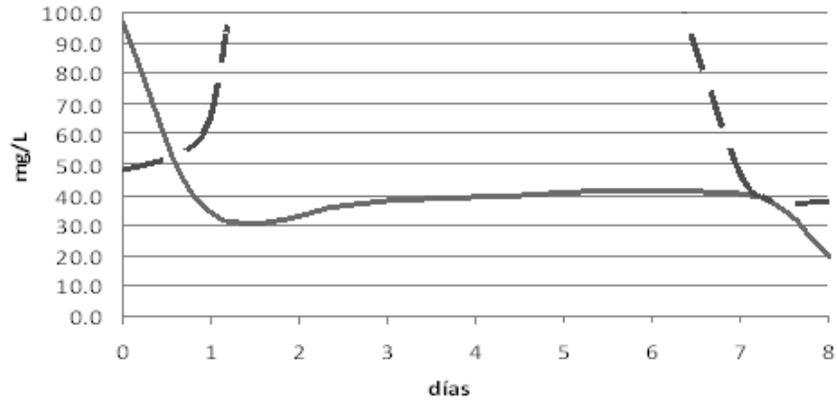


Figura 25. Seguimiento de la remoción de N-NH₄⁺ (línea continua) y N-NO₃⁻ (línea punteada) en el Tratamiento 3.

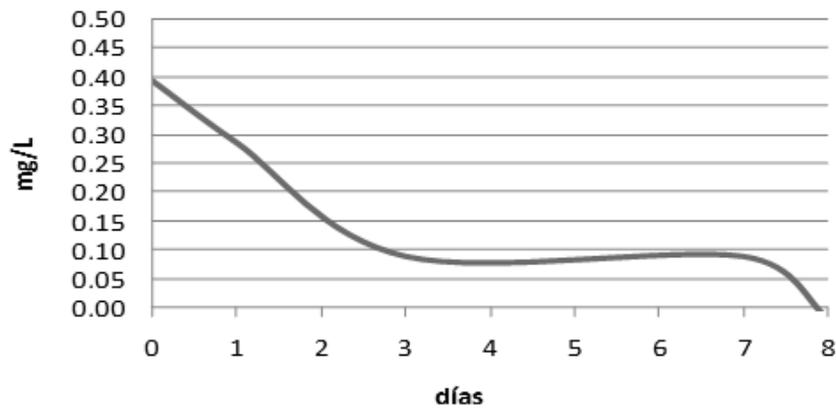


Figura 26. Seguimiento de la remoción de P-PO₄³⁻ en el Tratamiento 3.

A partir del día 6 en el Tratamiento 3 se detectó la aparición de nitrógeno en forma de nitritos (Figura 27). La detección de nitritos (NO₂⁻) podría indicar que el proceso de reducción se aceleró en los últimos días, lo cual sucedió solo en los tratamientos con alta concentración de nitrógeno inicial (100 mg/L). Estos datos muestran que parte del NO₃⁻ fue transformado en NO₂⁻ sin llegar a NH₄⁺, por lo tanto la cantidad de nitrógeno en forma de NO₂⁻ no alcanzó la forma de fácil absorción por las plantas. Sin embargo, la concentración de NO₂⁻ es tan pequeña (0.1 mg/L al día 8), que fue más importante la remoción de nitrógeno (86.7 mg/L removidos) que su transformación.

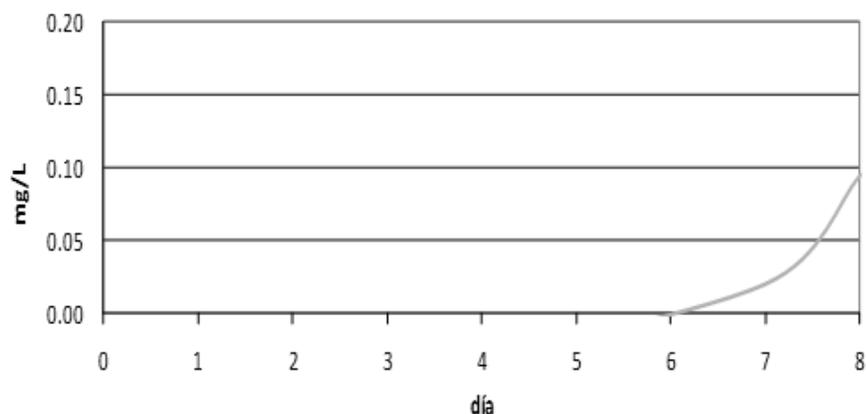


Figura 27. Seguimiento de N-NO_2^- en el Tratamiento 3.

5.2.1.4.- Tratamiento 4

El Tratamiento 4 contó inicialmente con concentración normal de nitrógeno (1.0 mg/L) y muy alta de fósforo (10.0 mg/L). La remoción tanto de NH_4^+ como de NO_3^- se llevó a cabo al primer día (70% y 56% respectivamente), posteriormente fluctuó un poco sin variar demasiado (figuras 28 y 29). En general, el nitrógeno (N-NH_4^+ y N-NO_3^-) a lo largo de este tratamiento, fue removido en un 72%.

A pesar de que la concentración inicial de fósforo fue muy elevada, la remoción que se llevó a cabo al primer día fue del 6.7%, el cual, a pesar de ser un bajo porcentaje, representa la remoción de 0.68 mg de fósforo. Para el día ocho, se removieron 0.95 mg (9.3% absorbido) (figuras 28 y 29).

La cantidad de fósforo removido de este tratamiento fue la mayor si se compara con los tratamientos uno a tres. El único tratamiento que sobrepasó las cantidades removidas fue el cinco. Es importante mencionar que los tratamientos cuatro y cinco fueron los que inicialmente contaban con la mayor cantidad de fósforo inicial (10 mg/L).

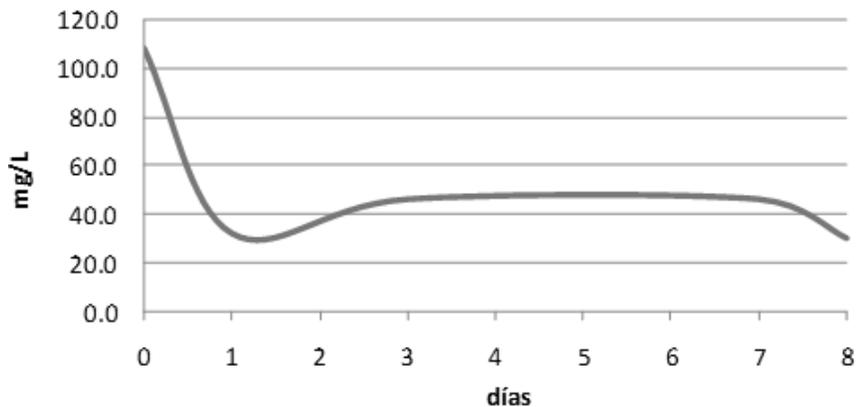


Figura 28. Seguimiento de la remoción de N-NH₄⁺ en el Tratamiento 4.

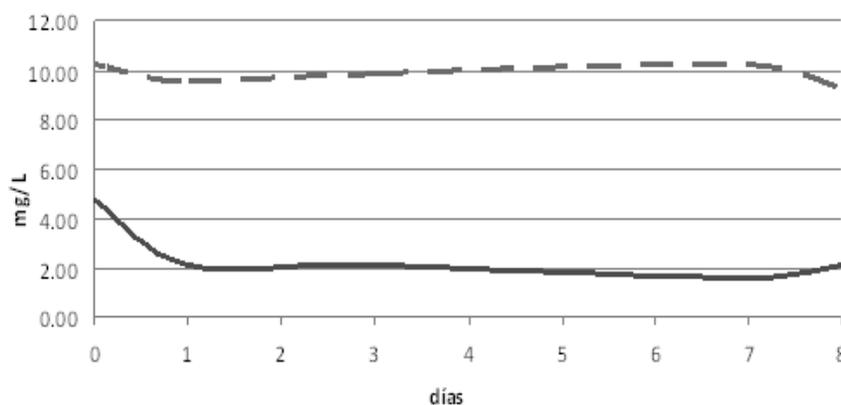


Figura 29. Seguimiento de la remoción de N-NO₃⁻ (línea continua) y P- PO₄³⁻ (línea punteada) en el Tratamiento 4.

5.2.1.5.- Tratamiento 5

La remoción de NH₄⁺ se dio de forma acelerada al primer día (44.4 % absorbido), al día ocho se removi6 el 65.3%, lo que representa 47.2 mg/L de nitr6geno en forma de NH₄⁺. En el caso del NO₃⁻, el valor inicial no coincidi6 con la concentraci6n de nitr6geno aportada originalmente, es por eso que la absorci6n se midi6 comparativamente a partir del tercer d6a, el cual cuenta con valores m6s cercanos a la concentraci6n esperada. Del tercer al s6ptimo d6a se absorbi6 un 15% del N- NO₃⁻ y al octavo un 21.4%. Es decir que del tercer al 6ltimo d6a se removieron 8.6 mg/L de N- NO₃⁻ (Figura 30). Esta remoci6n fue muy alta a comparaci6n con los otros tratamientos, a excepci6n del Tratamiento 3. Al final de este tratamiento, fue absorbido un 23% del nitr6geno (N-NH₄⁺ y N-NO₃⁻) inicialmente agregado.

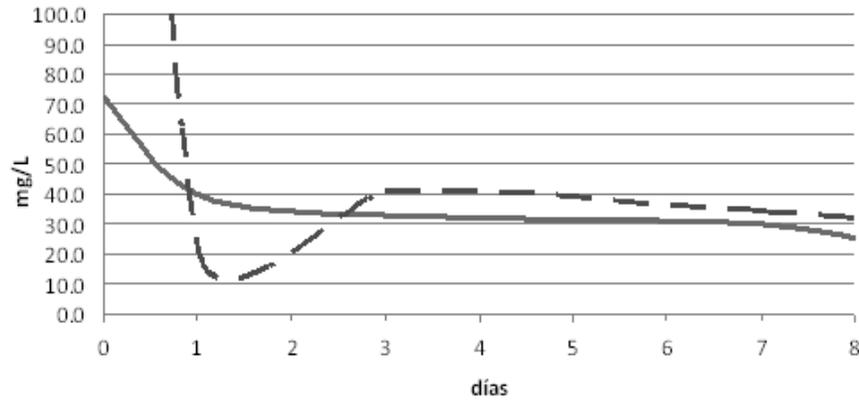


Figura 30. Seguimiento de la remoción de N-NH_4^+ (línea continua) y N-NO_3^- (línea punteada) en el Tratamiento 5.

En el caso del fósforo, en el tratamiento cinco se removieron 2.64 mg/L de P, que a pesar de solo estar representado por la remoción del 31%, fue la mayor concentración de fósforo removida (Figura 31). El tratamiento cinco, al igual que en el tratamiento tres, se detectó presencia de nitritos al día ocho (Figura 32); sin embargo, en este tratamiento se detectó una menor velocidad de aparición, así como una menor concentración al día 8.

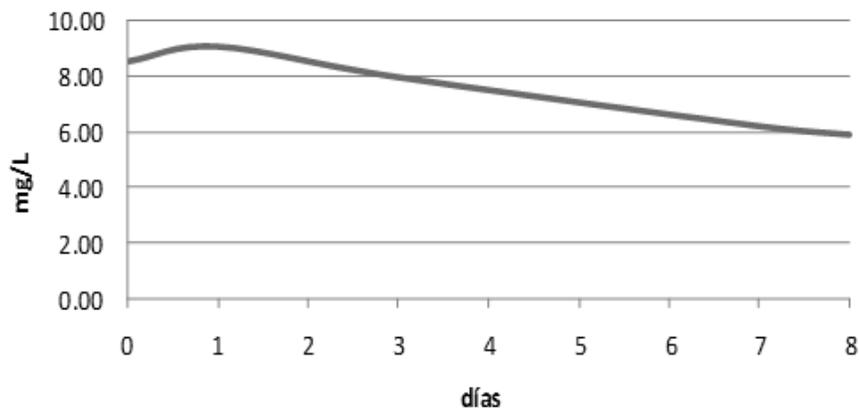


Figura 31. Seguimiento de la remoción de P-PO_4^{3-} en el Tratamiento 5.

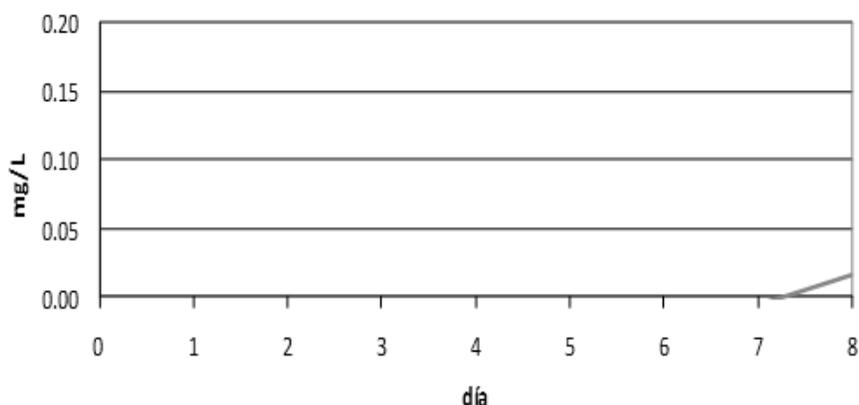


Figura 32. Seguimiento del N-NO₂⁻ en el Tratamiento 5.

5.2.1.6.- Comentarios generales sobre la remoción

El NH₄⁺ aparentemente es el compuesto nitrogenado que más fácil y rápidamente es asimilado, por lo que, se sugiere que en estudios posteriores se optimice este tipo de remoción con concentraciones distintas de nitrógeno pero en forma amoniacal inicial.

La concentración NH₄⁺ disminuyó considerablemente al primer día en todos los tratamientos, el pequeño aumento posterior en su concentración puede indicar que el NO₃⁻ se transformó en nitrógeno amoniacal, pero al día ocho este disminuyó aun más. Se observó que la concentración final disminuyó al compararlas con las iniciales, por lo que se puede afirmar que el nitrógeno en esta forma fue retirada.

Los resultados de remoción promedio de NH₄⁺ al primer y octavo día (57.5% y 68.3% respectivamente) son menores al 80% reportado en 48 hrs por Porath y Pollock (1982), sin embargo, superan al 40% obtenido al tercer día por Oron (1994). El promedio de NH₄⁺ removido al primer día concuerda con los valores promedio reportados por Caicedo (2005).

A pesar de que no fue detectado NO₂⁻ en los primeros días, los resultados muestran que al acercarse el final de los tratamientos con una concentración muy alta de

nitrógeno inicial (100 mg/L), se presentó un proceso de desnitrificación (reducción). Lo anterior puede indicar que parte del nitrógeno se haya volatilizado como N_2 .

El comportamiento irregular de los compuestos nitrogenados se puede deber en parte a la dinámica del ciclo del nitrógeno explicada con anterioridad. A pesar de eso, se puede afirmar que la concentración final es menor que la concentración inicial, lo que indica que el nitrógeno fue retirado del sistema en todos los tratamientos. Otro punto importante a considerar es que las muestras evaluadas fueron independientes, por lo que algunos resultados de laboratorio pudieron presentar reacciones de oxidación por agitación y otras de reducción por estar estáticas.

En el caso del fósforo, se obtuvo en promedio una remoción de $0.13 \text{ g/m}^2/\text{d}$, el cual coincide con los valores promedio reportados por Caicedo (2005). Por otra parte se observó que ante elevadas concentraciones, la absorción se lleva a cabo en mayor proporción. Sin embargo, la disminución de la concentración de fósforo quizá se deba a su posible precipitación, como sucede naturalmente en cuerpos de agua, en los cuales, el fósforo queda atrapado en el sustrato.

Tanto el tratamiento tres como el cinco, los cuales contaban con 100 mg/L de nitrógeno, fueron los que contaron con la mayor remoción de compuestos, incluso en el caso de fósforo a pesar de que contaron con distintas concentraciones iniciales de éste.

En general se puede afirmar que el tratamiento del agua por medio de *L. gibba* para retirar nitrógeno y fósforo es un sistema conveniente, ya que no solo disminuyen las concentraciones de los compuestos, sino que también se obtiene crecimiento de biomasa que al ser cosechada puede ser utilizada para otros fines. Esta es una importante ventaja que tendría un sistema de tratamiento a base de plantas acuáticas sobre un sistema de oxidación o estabilización, en el cual no se tiene producción de biomasa de fácil cosecha y su única función es la transformación de compuestos para su eliminación.

Con base en los resultados obtenidos, es importante considerar que el tiempo de retención de la macrófita en el agua a tratar depende del compuesto que se quiere eliminar o del que posee el medio en mayor cantidad; es decir, en el caso de compuestos nitrogenados, si el agua influente al sistema de tratamiento tiene gran cantidad de nitrógeno amoniacal, se observó en estos tratamientos que al primer día se pudo eliminar en promedio el 57.5%; en cambio, si el nitrógeno en el agua se encuentra como nitrato, a pesar de que en la mayoría de los tratamientos se obtuvo una reducción importante al primer día, otros tratamientos lo obtuvieron hasta el séptimo y octavo. Esto permite mencionar que la remoción del nitrato requiere de mayor tiempo, ya que su eliminación depende de la transformación a otras formas de nitrógeno. En el caso del fósforo, la mayor parte de los tratamientos presentó una reducción importante al tercer día y posteriormente se mantuvo una tasa de disminución constate en términos generales.

5.2.2.- Evaluación del crecimiento

Los resultados obtenidos en los experimentos para determinar los métodos más efectivos para la evaluación del crecimiento, marcaron la pauta para que a lo largo de los experimentos se cuantificara el crecimiento de la planta bajo dos variables: área cubierta y producción de biomasa como peso fresco y peso seco.

5.2.2.1.- Área cubierta

La macrófita se desarrolló en todos los tratamientos (Figura 33), sin embargo, el mayor crecimiento se obtuvo en los tratamientos 2, 3 y 5, los cuales contaban con una alta concentración de nitrógeno.

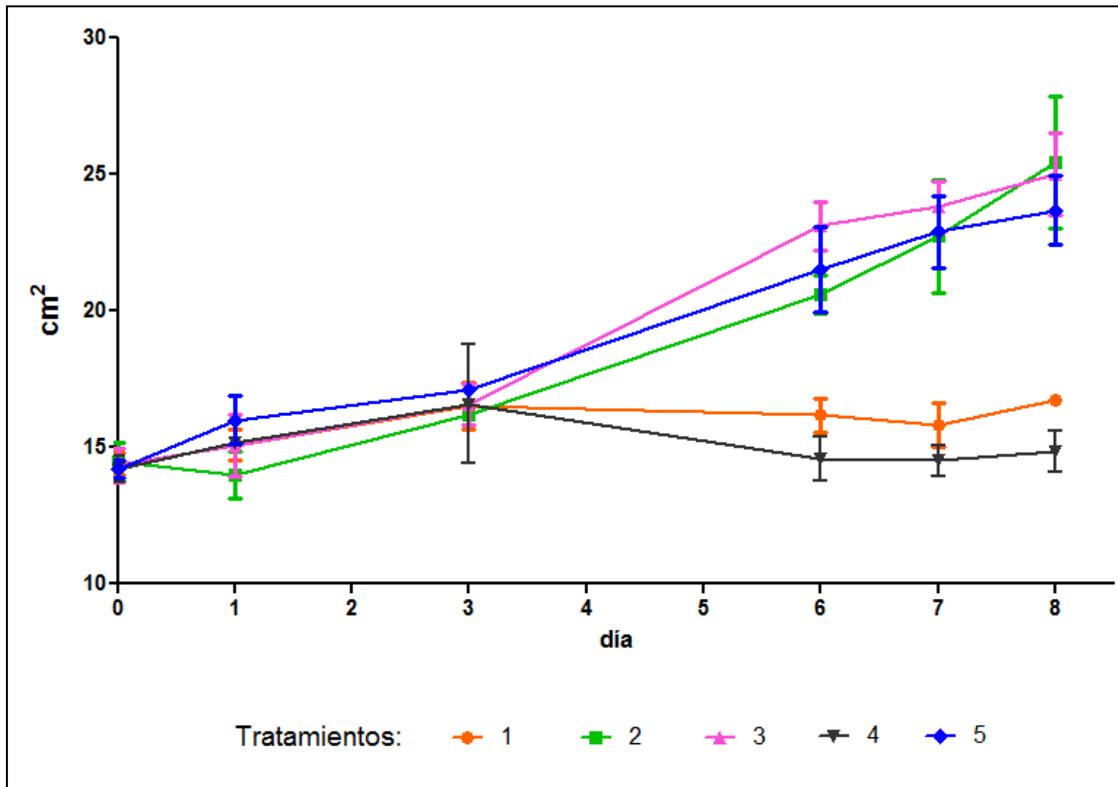


Figura 33. Área cubierta por *Lemna gibba* en cada tratamiento.

Tras realizar el análisis de varianza y prueba *post-hoc* (Cuadro 13), se detectó la formación de dos grupos significativamente diferentes ($P < 0.05$): tratamientos 1 y 4 (grupo A), con concentración de 1.0 mg/L de N; y los tratamientos 2, 3 y 5 (grupo B) que contaban con concentraciones de 10 y 100 mg/L de nitrógeno. Al comparar el Tratamiento 1 con el 5, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0.001$) a partir del sexto día; lo mismo ocurrió entre los tratamientos 2 y 4; entre 3 y 4; y entre 4 y 5. Entre el Tratamiento 2 y 3 solo difieren significativamente ($P < 0.05$) el día 6. Con base en lo anterior, los 2 grupos significativamente diferentes hacen referencia a la situación de eutrofización y niveles normales de nutrientes, es decir, el que contó con un gran crecimiento de la planta (tratamientos 2, 3 y 5) y en los que *L. gibba* presentó poco crecimiento (tratamientos 1 y 4) respectivamente.

Cuadro 13. Resultados de la prueba Bonferroni para el área cubierta entre tratamientos a partir del sexto día.

Tratamiento	Diferencias significativas (P < 0.05)*
1	A
2	B
3	B
4	A
5	B

*letras distintas se refieren a diferencias significativas entre tratamientos.

Quizá la disminución en la tasa de crecimiento de *L. gibba* en las últimas mediciones tanto del Tratamiento 3 como del 5, se vio afectada por la presencia de NO_2^- . La repentina aparición se debe a que en el medio se pudo haber estado llevando un proceso de reducción, el cual debía de acelerarse para que la reducción no se quedara en NO_2^- , sino que llegara a NH_4^+ y pudiera ser aprovechado por las plantas. Es probable que el pH jugara un papel importante en este aspecto, dado que un medio ácido propicia la presencia de NH_4^+ , por lo que es probable que, como ya se ha comentado, la planta favoreció un aumento en el pH del medio. Una solución para propiciar la reducción de NO_2^- a NH_4^+ podría ser acidificar un poco el medio o propiciar la presencia de bacterias desnitrificadoras.

Como se observa en la Figura 33, el crecimiento de *L. gibba* ante el Tratamiento 4 (1.0 mg/L de N y 10.0 mg/L de P) estuvo por debajo del Tratamiento 1 (1.0 mg/L de N y 0.1 mg/L de P), el cual contenía concentraciones normales esperadas en un cuerpo de agua estable. Esto indicaría que el crecimiento de *L. gibba* fue afectado por las altas concentraciones de fósforo, sin embargo no murió la planta y quizá con el tiempo hubiera podido recuperarse, ya que la tendencia de los nutrientes tiende a disminuir en todos los casos.

Por otra parte, el Tratamiento 2 (10.0 mg/L de N y 1.0 mg/L de P) expuso un mayor crecimiento en los últimos días. A pesar de que los tratamientos 3 y 5 (100 mg/L de N) no cuentan con esta aceleración final de crecimiento, se puede observar que éste se mantiene con una pendiente positiva, lo cual afirma su resistencia a muy altas concentraciones de nitrógeno. Dado que la concentración de fósforo fue diferente en

estos tres tratamientos (0.1, 1.0 y 10.0 mg/L), se puede afirmar que la concentración de fósforo ante altas concentraciones de nitrógeno no afectó el crecimiento de *L. gibba* ante estos tratamientos. Sin embargo, en el Tratamiento 4, con 1.0 mg/L de nitrógeno, la alta concentración de fósforo (10 mg/L) pareció influir en el crecimiento de la planta, ya que estuvo por debajo del crecimiento mostrado en el tratamiento de referencia (Figura 33). Esto también se observa en el Cuadro 14, donde la velocidad de crecimiento de este tratamiento es la menor y el tiempo de duplicación es el mayor. La mayor velocidad de crecimiento se obtuvo en el tratamiento dos, en el cual se reportó la producción de 2.4 cm² de cobertura de área por día y 9.8 días en duplicar la misma (Cuadro 14). El mejor tiempo de duplicación sobrepasa el óptimo reportado por Landolt (1975) de 1 a 5.3 días, debido a que este experimento se realizó en invierno, sin embargo la planta presentó un buen desarrollo.

Cuadro 14. Velocidad de crecimiento (Vc) y tiempo de duplicación (td) para el área cubierta por *Lemna gibba* ante cada tratamiento.

Tratamiento	Vc (cm ² por día)	td (días)
1	0.3	36.3
2	2.4	9.8
3	1.0	10.0
4	0.1	128.8
5	1.1	10.9

5.2.2.2.- Biomasa

Se cuantificó tanto el peso fresco como el peso seco (Figura 34), el cual como se describe anteriormente, representa la cantidad de biomasa que fue generada a lo largo del experimento. La mayor producción de biomasa se obtuvo en el grupo de tratamientos bajo eutrofización (2, 3 y 5).

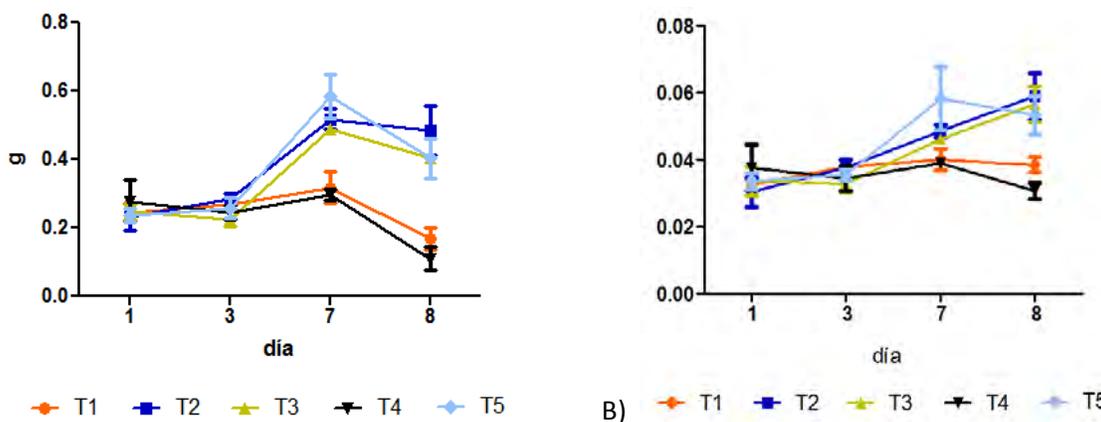


Figura 34. A) Peso fresco y B) peso seco en gramos de *Lemna gibba* por tratamiento con distintas concentraciones de nitrógeno y fósforo.

Con respecto al peso fresco, la prueba de ANOVA y la prueba *post-hoc* de Bonferroni muestran que el comportamiento es idéntico al mostrado por el área cubierta, en donde a partir del día 7 se forman dos grupos significativamente diferentes ($P < 0.001$), por debajo, con poco crecimiento, los tratamientos 1 y 4 (grupo A) y con un mayor peso los tratamientos 2, 3 y 5 (grupo B) (Cuadro 15).

Cuadro 15. Resultados de la prueba Bonferroni para peso fresco y seco entre tratamientos al séptimo día.

Tratamiento	Diferencias significativas ($P < 0.001$)*
1	A
2	B
3	B
4	A
5	B

*letras distintas se refieren a diferencias significativas entre tratamientos.

En cuanto al peso fresco, los mayores resultados fueron los que se presentaron ante tratamientos con una alta concentración de nitrógeno (10 y 100 mg/L). Al parecer, el fósforo no es un elemento limitante para el crecimiento por sí solo, pero si lo es al encontrarse en relación con nitrógeno y se afirma, como bien mencionan Al-Hamdani y Sirna (2008), que el incremento del crecimiento en *L. gibba* es independiente de la variación de la concentración de fósforo. Aún así, los elementos parecen tener una relación favorable al crecimiento de *L. gibba*, dado que el Tratamiento 5 (100 mg/L de N y 10 mg/L de P) resultó tener la mayor producción de biomasa al día 7 (Figura 34a);

lo mismo ocurrió con el experimento de Al-Hamdani y Sirna (2008), quienes utilizaron *Salvinia minima* Baker.

El peso seco conforma entre el 10 y el 14% del peso fresco total de la planta. Como se puede observar en la Figura 34b, el peso seco sigue la tendencia observada tanto en el peso fresco como en el área cubierta y se observa claramente con diferencias significativas, donde los tratamientos 1 y 4 son diferentes a los 2, 3 y 5.

Monette *et al.*, (2006) obtuvo en siete días una tasa de crecimiento en biomasa (peso seco) de 88 g/m^2 (1470 g/m^2 peso fresco) a una densidad inicial de biomasa de peso seco de 45 g/m^2 (750 g/m^2 de peso fresco). En este caso, la mayor producción de biomasa (peso seco) al séptimo día fue de 24 g/m^2 (200 g/m^2 peso fresco) partiendo de una densidad inicial de 20 g/m^2 en peso seco.

El promedio de peso fresco producido por día en los tratamientos 1 y 4 (0.01 g/d) fue distinto al obtenido en los tratamientos 2, 3 y 5 (0.06 , 0.07 y 0.08 g/d), los cuales, a pesar de ser los más altos, no se comparan con los obtenidos por Oron (1994) de 0.1 y 0.35 g/d .

A pesar de que en las lagunas de oxidación (sin plantas acuáticas) se tiene un resultado parecido de eliminación de nutrientes, una laguna de lemnáceas puede ser ventajosa ya que produce gran cantidad de biomasa que puede ser aprovechada para otros fines como alimentación de aves y animales de corral con un alto valor proteico.

5.2.3.- Determinación de clorofila

La concentración de clorofila de la planta está íntimamente relacionada con la concentración de los nutrientes y se observó a primera instancia por la coloración de las plantas al final del experimento (Figura 35), lo cual es congruente con el desarrollo de la planta. Las lemnáceas ante los tratamientos 1 y 4, con concentración baja de nitrógeno (1.0 mg/L), mostraron una coloración café-amarillenta (clorosis), mientras que las producidas en los tratamientos 2, 3 y 5, con mayores concentraciones de nitrógeno (10 y 100 mg/L), mostraron una coloración verde brillante (Figura 35),

haciendo referencia a su vigor. En especial los tratamientos 3 y 5, con la mayor concentración de nitrógeno inicial, contaron con la mayor coloración verde.

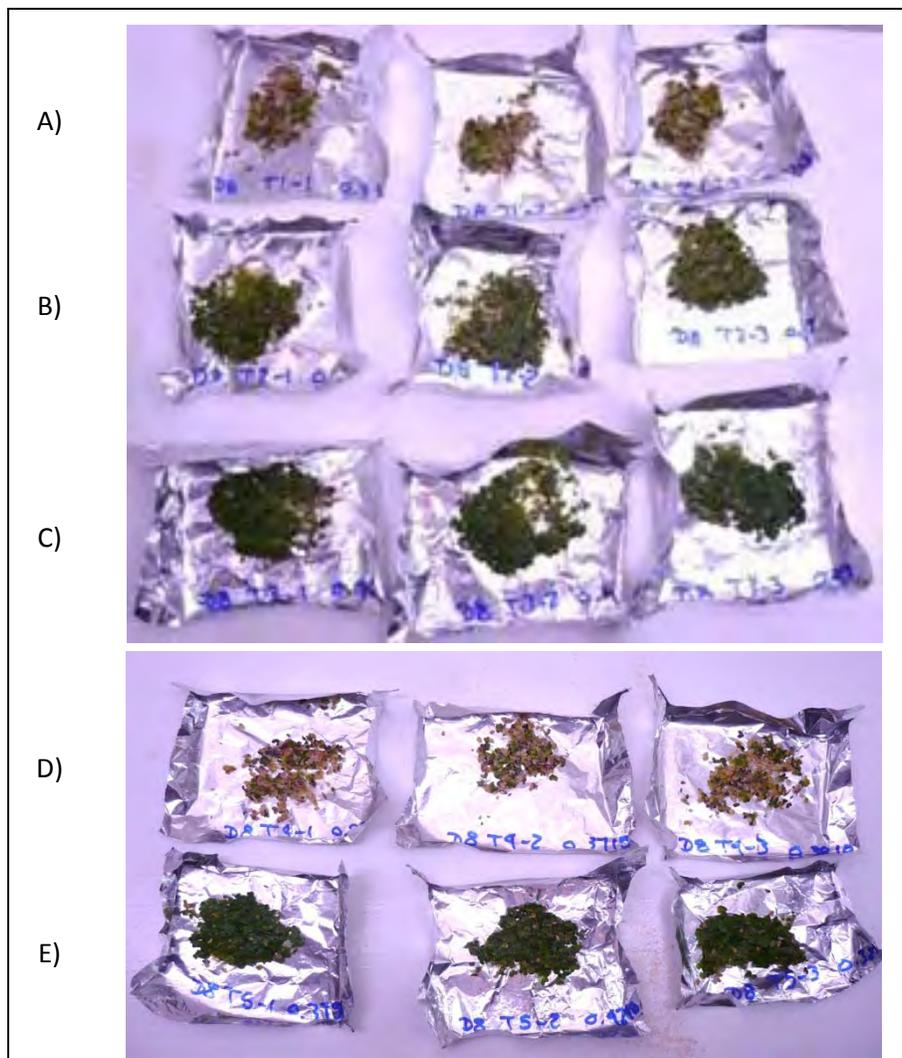


Figura 35. Fotografía de *Lemna gibba* ante cada tratamiento (tres repeticiones).

A) Tratamiento 1. B) Tratamiento 2. C) Tratamiento 3. D) Tratamiento 4. E) Tratamiento 5.

Nótese la distinta coloración entre tratamientos.

La remoción de los compuestos nitrogenados tiene relación con los resultados obtenidos de la medición de clorofila (Figura 36), ya que al término de los mismos y en todos los casos, tanto la clorofila a como la b tienden a incrementar, sobretodo en los experimentos que cuentan con la mayor presencia de nitrógeno (tratamientos 2, 3 y 5).

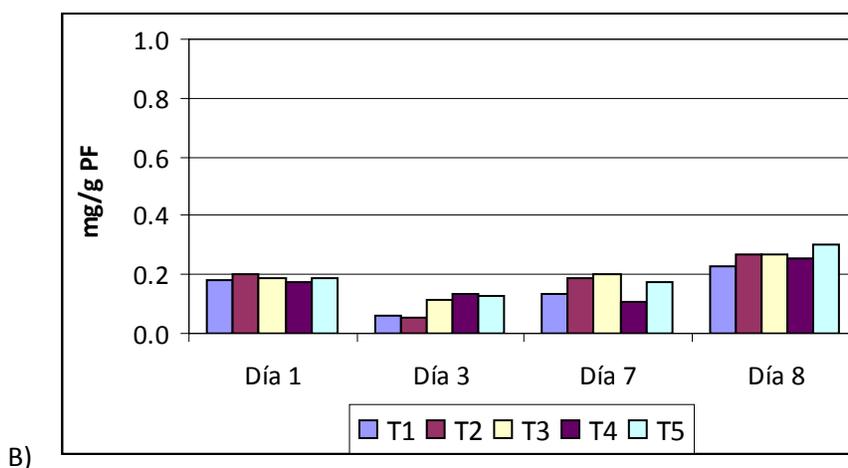
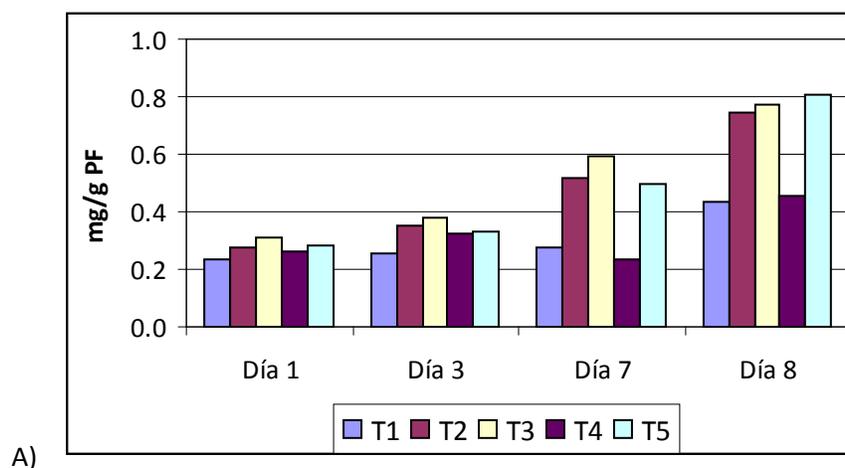


Figura 36. Concentración de A) clorofila a y B) clorofila b en mg/g de peso fresco (PF) de *Lemna gibba* a distintas proporciones de N:P.

Al realizar la prueba de ANOVA y prueba *post-hoc* de Bonferroni en cuanto a la concentración de clorofila a, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$), contando con una mayor significancia ($P < 0.01$) el Tratamiento 5. Una vez más se generaron dos grupos significativamente diferentes (Cuadro 16) en cuanto a la concentración de clorofila a; en el caso de la clorofila b no se presentaron diferencias significativas.

Cuadro 16. Resultados de la prueba Bonferroni para la concentración de clorofila a entre tratamientos al último día.

Tratamiento	Diferencias significativas (P < 0.05)*
1	A
2	B
3	B
4	A
5	B

*letras distintas se refieren a diferencias significativas entre tratamientos.

Los tratamientos 2, 3 y 5 tuvieron las mayores concentraciones de clorofila tanto a como b, lo que significa que presentaron una alta tasa fotosintética que conlleva al aumento en la concentración de pigmentos fotosintéticos como bien mencionan Al-Hamdani y Sirna (2008) y está directamente relacionado con el crecimiento de la planta. Esto se observó en los tratamientos 2, 3 y 5, los cuales contaban con altas concentraciones de nitrógeno. El tratamiento con mayor concentración de clorofila a y b fue el 5, el cual contó con una relación N:P de 10:1 (100 mg/L de N y 10 mg/L de P) y fue en el que se presentó el mejor crecimiento de *L. gibba*. Este tratamiento fue seguido por el 3, que contenía 100 mg/L de nitrógeno y 0.1 mg/L de fósforo. Por lo que se puede inferir que el nitrógeno es el factor principal para propiciar una alta actividad fotosintética.

Tanto el Tratamiento 1 como el 4, los cuales contaban con bajas concentraciones de nitrógeno, tuvieron las menores proporciones en ambos tipos de clorofila. El Tratamiento 4 fue el que tuvo el menor crecimiento, incluso por debajo del tratamiento de referencia tanto en área cubierta como en biomasa.

A pesar de que Zhen-Gang (2008) mencionan que el fósforo es determinante para el crecimiento de plantas acuáticas, al observar que los tratamiento 4 y 5, con alta concentración de fósforo (10 mg/L de P), fueron significativamente diferentes (P<0.05) tanto en el crecimiento de la planta como en concentración de clorofilas, se puede afirmar que la concentración de fósforo no fue limitante para el desarrollo de la planta, pero la relación nitrógeno- fósforo en conjunto si pueden influir en el crecimiento de *L. gibba*.

6.- Conclusiones

Dadas las observaciones realizadas se puede afirmar que el medio de cultivo más adecuado y en el que el crecimiento fue más favorable para *Lemna gibba* fue Hoagland al 25%.

Los factores ambientales más apropiados para *L. gibba* fueron una radiación fotosintéticamente activa de $21.55 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y un pH de 4.5 a 8.5.

Un inóculo de aproximadamente 40% de cobertura, favoreció la sobrevivencia ante contaminación de algas y pH ácido, el cual tendió a aumentar.

El método más eficiente para conocer el crecimiento de *L. gibba* fue la medición cuantitativa del área cubierta. La cuantificación de biomasa (peso fresco y seco) contribuyó importantemente a la determinación del desarrollo de la planta.

Ante altas concentraciones de nitrógeno, el fósforo no influyó significativamente en el crecimiento de la planta.

Una proporción N:P donde es mayor el nitrógeno que el fósforo, fue favorable para la producción de biomasa de *L. gibba*.

El compuesto nitrogenado mayormente removido fue el nitrógeno amoniacal.

Los análisis mostraron que ante estos parámetros ambientales, el tiempo de retención de la macrófita en el agua a tratar depende del compuesto que se pretende eliminar o del que posee el medio en mayor cantidad; para nitrógeno amoniacal al primer día, nitrato hasta el séptimo y octavo, para fósforo al tercer día.

Ante una concentración alta de fósforo, *L. gibba* tuvo una remoción más efectiva que la que se llevó ante bajas concentraciones.

7.- Referencias

- Al-Hamdani, S. y Sirna, C. B. 2008. Physiological responses of *Salvinia minima* to different phosphorus and nitrogen concentrations. *Amer. Fern. J.* 98(2):71-82.
- Al-Nozaily, F., Alaerts, G. y Veenstra, S. 2000. Preference of duckweed-covered sewage lagoons-II. Nitrogen and phosphorus balance and plant productivity. *Water Res.* 34(10):2727-2733.
- Anger, M., Hugin, H., Huth, C. y Kuhbauch, W. 2002. Nitrate leaching from intensively and extensively grazed grassland measured with suction cup samplers and sampling of soil mineral-N influence of pasture management. *J. Plant Nutr. Soil Sc.* 165: 640 - 647.
- Ansari, A. y Khan, F. 2006. Studies on the role of selected nutrient sources in the eutrophication of freshwater ecosystems. *Nat. Environ. Pollut. Tech.* 5(1):47-52.
- Arroyave, M. 2004. La lenteja de agua, (*Lemna minor* L.): una planta acuática promisoría. Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colombia). *Rev. EIA* 1:33-38.
- Bouda, S y Chien, Y. 2005. Productivity comparison of two duckweed species (*Lemna perpusilla* and *Spirodela polyrrhiza*) cultured under various environment. *J. Fish. Soc. Taiwan* 32(2):149-157.
- Bowers-Irons, G. 1992. Minimization of organic and metallic industrial waste via *Lemna minor* concentration. Technical Research Associates, Inc. AFSC. Salt Lake City, Utah, EUA. 34 p.
- Brix, H. y Schierup, H. 1989. The use of aquatic macrophytes in water-pollution control. *Ambio* 18(2):100-107.
- Caicedo, J. R. 2005. Effect of operational variables on nitrogen transformations in duckweed stabilization ponds. Tesis doctoral. Universidad Wageningen, Países Bajos. 163 p.
- Carpenter, S. 2005. Eutrophication of aquatic ecosystems: Bistability and soil phosphorus. *PNAS* 102(29):10002–10005. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?tool=pmcentrez&artid=1177388&blobtype=pdf> (5 de diciembre de 2008).
- Chandra, P. y Kulshreshtha, K. 2004. Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *Bot. Rev.* 70(3): 313–327

- Clatworthy, J. N. y Harper, J. L. 1962. The comparative biology of closely related species living in the same area. V. Inter- and intaspecific interference within cultures of *Lemna* spp. and *Salvinia natans*. *J. Exp. Bio.* 13:307-324.
- Cole, T. y Voskuil, I. 1996. Population genetic structure in duckweed (*Lemna minor*, Lemnaceae). *Can. J. of Bot.* 74(2):222-230.
- Dhote, S. y Dixit, S. 2008. Water quality improvement through macrophytes - A review. *Environ. Monit. Assess.* 152(1-4):149-153.
- Dinges, R. 1978. Aquatic vegetation and water pollution control public health implications. *Am. J. Public Health* 68(12): 1202-1205.
- Espinoza, J. C. F., Caicedo, B. J. R. y Sanabria, G. J. 2002. Desempeño de un sistema experimental de lagunas duckweed en serie con y sin pretratamiento anaeróbico. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Cancún, México. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/mexico26/ii-036.pdf> (19 de noviembre de 2009).
- Garbisu, C. y Alkorta, I. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technol.* 77:229-236
- Gray, N. 2004. Biology of wastewater treatment. Segunda edición. Serie Environmental Science and Management. Volumen 4. Editorial Imperial Collage Press. Londres. 1421 p.
- Haustein, A. T., Gilman, R.H., Skillicorn, P.W., Vergara, V., Guevara, V., Gastanaduy, A. 1990. Duckweed, a useful strategy for feeding chickens: performance of layers fed with sewagegrown Lemnaceae species. *Poultry Sci.* 69: 1835-1844.
- Hammer, D. A. 1989. Constructed wetlands for wastewater treatment: municipal, industrial and agricultural. Lewis Publishers. Chelsea, Michigan, E.U.A. 831 p.
- Harvery, R. y Fox, J. 1973. Nutrient removal using *Lemna minor*. *J. Water Pollut. Control Fed.* 45: 1928-1938.
- Hoagland, D. R. y Arnon, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular 347:1-32.

- Jain, S. K., Gujral, G. S., Jha, N. K. y Vasudevan, P. 1992. Production of biogas from *Azolla pinnata* R.Br and *Lemna minor* L.: effect of heavy metal contamination. *Bioresource Technol.* 41: 273-277.
- Journey, W., Skillicorn, P. y Spira, W. 1991. Duckweed aquaculture: a new aquatic farming system for developing countries. The World Bank Emena Technical Department Agriculture Division. 68 p.
- Kadlec, R., Knight, R., Vymazal, J., Brix, H., Cooper, P. y Haberl, R. 2000. Constructed wetlands for pollution control: processes, performance, design and operation. Scientific and Technological Report No. 8. International Water Association. Londres. 172 p.
- Khan, F. A. y Ansari, A. A. 2005. Eutrophication: an ecological vision. *Bot. Rev.* 71(4):449-482.
- Körner, S. y Vermaat, J. E. 1998. The relative importance of *Lemna gibba* L., bacteria and algae for the nitrogen and phosphorus removal in duckweed-covered domestic wastewater. *Water Res.* 32 (12): 3651–3661.
- Körner, S., Vermaat, J. E. y Veenstra, S. 2003. The capacity of duckweed to treat wastewater: ecological considerations for a sound design. *J. Environ. Qual.* 32: 1583-1589.
- Landolt, E. 1975. Morphological differentiation and geographical distribution of the *Lemna gibba-Lemna minor* group. *Aquat. Bot.* 1: 345-363.
- Landolt, E. 1985. Biosystematic investigations on the family of duckweeds (Lemnaceae). Vol. 2. The Family of Lemnaceae- a monographic study. Vol. 1. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes ETH, Stiftung Rübel, Zürich, Alemania. 566 p.
- Landolt, E. y Kandeler, R. 1987. The family of Lemnaceae - a monographic study. Vol. 2, Phytochemistry, physiology, application, bibliography. Veroff. Geobot. Institute ETH, Zurich. 638 p.
- Lawson, T. B. 2002. Fundamentals of aquacultural engineering. Segunda impresión. Klumer Academic Publishers. EUA. 364 p. Disponible en http://books.google.com.mx/books?id=cXF8gzWFWEYC&pg=PA30&lpg=PA30&dq=nitrogen+cycle+water+NH4+NO3+NO2+pH&source=bl&ots=R7IVFGh_z5&sig=BF9Ch0jHM B8mJh1bVAIJe_hjl0o&hl=es&ei=HdPMSr-

hMd2JtgeTipHuAQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=8#v=onepage&q=nitrogen%20cycle%20water%20NH4%20NO3%20NO2%20pH&f=false (7 de octubre de 2009).

- Leng, R. A., Stambolie, J. H. y Bell, R. 1995. Duckweed - a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish. *Livestock Research for Rural Development*. Centre for Duckweed Research & Development University of New England Armidale 7(1). Disponible en: <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/lrrd/lrrd7/1/3.htm> (10 de febrero de 2008).
- Les, H. D., Crawford, D. J., Landolt, E., Gabel, J. D. y Kimball, R. T. 2002. Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the duckweed family. *Syst. Bot.* 27(2):221-240.
- López, M. S., Gallegos, M. M. E., Pérez, F. L. J. y Gutiérrez, R. M. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. UNAM. México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21(2):91-100.
- Maclachalam S. y Zalik S. 1963. Plastid structure, chlorophyll concentration and free amino acid composition of a chlorophyll mutant of barley. *Can. J. Bot.* 41:1053-1062.
- Martínez, C. P., Hernández, M. A., Soto, C. S., Esquivel, H. A. y Rangel, L. J. 2006. Use of constructed wetlands for the treatment of water from an experimental channel at Xochimilco, Mexico. UAM-I. México. *Hidrobiológica* 16(3): 211-218.
- Miranda, M. G. 1998. Estudio sobre absorción de plomo por *Lemna gibba* L.: cambios bioquímicos básicos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 96 p.
- Miranda, M. G. e Ilangovan, K. 1996. Uptake of lead by *Lemna gibba* L.: influence on specific growth rate and basic biochemical changes. *B. Environ. Contam. Tox.* 56(6): 1000-1007.
- Miranda, M. G., Quiroz, A. y Salazar, M. 2000. Cadmium and lead removal from water by the duckweed. *Lemna gibba* L. (Lemnaceae). *Hidrobiología* 10 (1):7-12.
- Monette, F., Lasfar S., Millette L. y Azzouz A. 2006. Comprehensive modeling of mat density effect on duckweed (*Lemna minor*) growth under controlled eutrophication. *Water Res.* 40:2901 - 2910.
- Morales, N., Arévalo, K., Ortega, J., Briceño, B., Andrade, C., y Morales, E. 2006. El pH y la fuente nitrogenada como moduladores del crecimiento de la macrófita *Lemna* sp. Venezuela. *Rev. Fac. Agron.* 23:67-79. Disponible en:

- http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/enero_marzo2006/N.%20Morales.pdf (10 de junio de 2008).
- Moretti, A. y Gigliano, G. S. 1988. Influence of light and pH on growth and nitrogenase activity on temperate-grown azolla. *Biol. Fert. Soils* 6:131–136.
- Ngo, V. 1987. Boosting pond performance with aquaculture operation forum. *WPCF* 4(8):20-23.
- Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/Pages/normasoficialesmexicanasvigentes.aspx> (10 de junio de 2008).
- Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/Pages/normasoficialesmexicanasvigentes.aspx> (10 de junio de 2008).
- OECD. 2006. Guidelines for testing of chemicals: *Lemna* sp. growth inhibition test. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris. Section 2. No. 221. 22 p.
- Olgún, E., Sánchez, G. y Hernández, E. 2000. Environmental biotechnology and cleaner bioprocesses. Editorial Taylor & Francis. 319 p.
- Oron, G. 1994. Duckweed culture for wastewater renovation and biomass production. *Agr. Water Manage.* 26:27-40
- Palafox, P., Febrero, J., González, I., Romero, R. y Estrada, O. 2005. Perspectivas de la *Lemna* sp. para alimentación de peces. *REDVET* 6(3): 1-6. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030305/030513.pdf> (12 de junio del 2008).
- Porath, D. y Pollock, J. 1982. Ammonia stripping by duckweed and its feasibility in circulating aquaculture. *Aquat. Bot.* 13:125-135.
- Primo, E. y Carrasco, J. M. 1973. Química agrícola. Editorial Alhambra. España. 178-315 pp.
- Ran, N., Agami, M. y Oron, G. 2004. A pilot study of constructed wetlands using duckweed (*Lemna gibba* L.) for treatment of domestic primary effluent in Israel. University of the Negev, Israel. *Water Res.* 38:2241–2248.

- Rauch, W. y Harremoes, P. 1996. The importance of the treatment plant performance during rain to acute water pollution. *Water Sci. Technol.* 34(3): 1–8.
- Reddy, K. y Busk, W. 1985. Nutrient removal potential of selected aquatic macrophytes. *J. Enviro. Qual.* 14(4):459-462.
- Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N., Dushenkov, V., Ensley, B., Chet, I. y Raskin, I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nat. Biotechnol.* 13:468-474.
- Seoáñez, M. y Gutiérrez, A. 1999. Aguas residuales: tratamiento por humedales artificiales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- Tront, J.M. y Saunders, F.M. 2006. Role of plant activity and contaminant speciation in aquatic plant assimilation of 2,4,5-trichlorophenol. *Chemosphere* 64(3): 400-407.
- Vermaat, J.E. y Hanif, M.K. 1998. Performance of common duckweed species (Lemnaceae) and the waterfern *Azolla filiculoides* on different types of wastewater. *Water Res.* 32(9):2569-2576.
- Viessman, W. y Hammer, M. J. 2005. Water supply and pollution control. Séptima edición. Ed. Pearson Prentice Hall. 751- 765 pp.
- Wang, W. 1990. Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ. Res.* 52:7-22.
- Wardlaw, C. 1952. Phylogeny and morphogenesis. Macmillan and Co. Limited. London. 536 p.
- Weis, J. y Weis, P. 2004. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environ. Int.* 30:685 - 700.
- Young-Ho, A. 2006. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: a review. *Process Biochem.* 41:1709-1721
- Yu, X. Z. y Gu, J. D. 2007. Accumulation and distribution of trivalent chromium and effects on hybrid willow (*Salix matsudana* Koidz 3 *alba* L.) metabolism. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 503–511.
- Zhen-Gang, J. 2008. Hydrodynamics and water quality: modeling rivers, lakes and estuaries. John Wiley & Sons. EUA. 676 p. Disponible en: http://books.google.com.mx/books?id=QIsyeYzCZnsC&printsec=frontcover&source=gs_bv2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false (7 de octubre de 2009).

Zimmo, O. R. 2003. Nitrogen transformations and removal mechanisms in algal and duckweed waste stabilization ponds. Tesis Doctoral. Universidad de Wageningen. Países Bajos. 133 p.

Zimmo, O. R., van del Steen, N. P. y Gijzen, H. J. 2004. Nitrogen mass balance across pilot-scale alga and duckweed-based wastewater stabilization ponds. *Water Res.* 38: 913-920.

ANEXO A

Medio de cultivo Hoagland modificado
(Hoagland y Arnon, 1950; Miranda, 1998).

Macronutrientes		Litro final
1M	Ca(NO ₃) ₂	5 ml/L
1M	KNO ₃	5 ml/L
1M	MgSO ₄	2 ml/L
1M	KH ₂ PO ₄	1 ml/L
0.1M	FeEDTA*	1 ml/L

* FeEDTA	g/L
EDTA.2Na △	10.4 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	7.8 g

Micronutrientes (1mL/L final)	
H ₃ BO ₃	2.86 g/L
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.81 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.23 g/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025 g/L
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.05 g/L
pH 5.5 +/- 0.2	

ANEXO B

Método para la determinación compuestos nitrogenados y fosfatos (Primo y Carrasco, 1973)

1. Determinación de Nitratos

Preparación de Reactivos

Solución madre de 10 ppm de nitrato de potasio: Curva patrón de 5 puntos con concentraciones de 0-10 ppm.

Preparación del ácido fenoldisulfónico: 25 g de fenol, agregar 150 mL de ácidos sulfúrico concentrado y dejar en un baño maría durante dos horas.

Procedimiento:

- a) Tomar 5 mL de muestra y secar a 105°C por 24 horas.
- b) Agregar 2 mL del ácido fenoldisulfónico y 20 mL de agua desionizada.
- c) Dejar reposar 2 minutos.
- d) Agregar 7 mL de KOH 12M despacio.
- e) Aforar a 100 mL agua destilada y esperar a la aparición de un color amarillo.
- f) Leer en espectrofotómetro a 420nm. Se utilizó un espectrofotómetro ThermoSpectronic Helios.

2. Determinación de Nitritos

Preparación de Reactivos

Solución madre de 1ppm de nitrito de sodio: Curva patrón de 5 puntos con concentraciones de 0 a 1 ppm.

Preparación de ácido sulfanílico: 0.8 g de ácido sulfanílico, disolver en 50 mL de ácido acético 5N y aforar a 100 mL con este mismo reactivo.

Preparación de alfa naftilamina: 0.5 g de alfa naftilamina, disolver en 50 mL de ácido acético 5N y aforar a 100 mL con este mismo reactivo.

Procedimiento:

- a) Tomar 5 mL de muestra.

- b) Agregar 1 mL de ácido sulfanílico.
- c) Agregar 1 mL de la solución de alfa naftilamina.
- d) Aforar a 50mL de agua destilada.
- e) Dejar reposar 10 minutos.
- f) Leer en espectrofotómetro a 520 nm. Se utilizó un espectrofotómetro ThermoSpectronic Heλios.

3. Determinación de Nitrógeno Amoniacal

Preparación de ácido bórico con indicadores:

Solución de indicadores: 0.33 g de verde de bromocresol y 0.165 g de rojo de metilo disolverlos en 500 mL de etanol; la solución presenta un color negro. Pesar 20 g de ácido bórico y disolver en 500 mL de agua destilada. La solución preparada de indicadores mantiene su actividad solamente por 24 horas.

Procedimiento:

- a) Tomar 5 mL de muestra.
- b) Agregar 45 mL de agua desionizada y 0.2 g de óxido de Magnesio.
- c) Destilar por 5 minutos y captar el destilado en 20 mL de solución de ácido bórico con indicadores (presenta un color verdoso). Se utilizó un destilador Vapodest20, marca Gerhardt.
- d) Titular con ácido sulfúrico 0.01 M; debe esperarse el vire a color violeta-negro.

4. Determinación de Fosfatos

Preparación de Reactivos

Solución de tartrato de antimonio y potasio al 0.5%. Pesar 0.5 g de $K(SbO) C_4H_4O_6 \cdot 1/2 H_2O$, disolver y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución de molibdato de amonio $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O]$. Disolver 20 g de molibdato de amonio $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O]$ en 300 mL de agua destilada. Agregar lentamente 450 mL de H_2SO_4 (14N) (194.4 mL H_2SO_4 concentrado diluido a 500 mL con agua da una concentración de aproximadamente 14 N); mantener en constante agitación cuidadosamente. Agregar 100 mL de una solución al 0.5% (p/v) de tartrato de antimonio y potasio. Diluir las mezclas a 1 litro con agua destilada. Este frasco se debe mantener tapado con papel aluminio y protegido de la luz.

Solución reductora con ácido ascórbico. Disolver 0.50 g de ácido ascórbico con un poco de solución patrón de molibdato de amonio y aforar a 100 mL con la misma solución. Esta solución es preparada cada vez que se vaya a formar color.

Solución patrón de 200 mg/L de fósforo. Disolver en agua destilada 0.8786 g de fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4) previamente seco al horno y aforarla a un litro. Esta solución contiene 200 mg/L y debe guardarse refrigerada en frasco de plástico o de vidrio blando (no pyrex) para evitar contaminación con arsénico. Algunos autores recomiendan agregar antes de enrasar 25 mL de H_2SO_4 7N, lo cual ayudará a su conservación indefinida.

Solución patrón de 10 mg/L de fósforo. Diluir 10 mL de la solución de 200 mg/L de fósforo en 200 mL con agua destilada.

Procedimiento:

- a) Tomar una alícuota de 5 mL de la muestra y colocarla en un matraz aforado de 50 mL.
- b) Adicionar agua hasta completar aproximadamente 40 mL.
- c) Agregar 5 mL de la solución reductora, agitar y aforar.
- d) Esperar 30 minutos.
- e) Leer en espectrofotómetro la intensidad de la absorción de luz a 882 nm. Se utilizó un espectrofotómetro ThermoSpectronic Heλios.
- f) Preparar blancos siguiendo el mismo procedimiento que en las muestras.
- g) Preparar una curva de calibración que contenga puntos correspondientes a 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg/L de fósforo. Para ello colocar en matraces aforados de 50 mL 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mL de la solución de 10 mg/L de fósforo y proseguir en la forma descrita para las muestras.
- h) Llevar a aproximadamente 40 mL con agua y adicionar 5 mL de la solución reductora, agitar y aforar.
- i) Esperar 30 minutos y leer la intensidad de la absorción de luz a 882 nm. Se utilizó un espectrofotómetro ThermoSpectronic Heλios.

ANEXO C

Determinación de clorofila a y b

(Yu y Gu, 2007)

Procedimiento:

- a) Se pesaron 0.1 g de peso fresco (fw) de *Lemna* sp. y se molieron, colocando el polvo en recipientes de vidrio. Se llevó a un volumen de 10 mL con acetona al 80%.
- b) Los matraces se colocaron en obscuridad por 24 horas.
- c) La absorción de luz se cuantificó a 645 y 663 nm en celdas a una distancia recorrida por la luz de 1 cm, contra blancos de acetona al 80%. Se utilizó un espectrofotómetro ThermoSpectronic Helios.
- d) La cantidad de clorofila a y b en las plantas fue calculada por la siguiente fórmula (Ecuación 3) de Maclachalam y Zalik (1963).

$$C_a = \frac{(12.3 D_{663} - 0.86 D_{645}) \cdot V}{d \cdot 1000 \cdot W}$$

$$C_b = \frac{(19.3 D_{645} - 3.60 D_{663}) \cdot V}{d \cdot 1000 \cdot W}$$

(ec. 3)

Donde:

Ca= concentración de clorofila a (mg/g fw)

Cb= concentración de clorofila b (mg/g fw)

D= densidad óptica a un longitud de onda específica

V= volumen final (mL)

W= peso fresco de planta (g)

d= distancia del paso de la luz (cm)