

25. Medio Ambiente

Evaluación del potencial depurador y fermentativo de ecotipos de lenteja de agua (Lemna sp.)

Capriotti, Guadalupe¹ guadalupecapriotti@yahoo.com.ar ; Portela Silvina² portela.silvina@inta.gob.ar ; Torti María Juliana² torti.maria@inta.gob.ar ; Alegre Mariana^{1,2} malegre@comunidad.unnoba.edu.ar ; Farroni Abel^{1,2} farroni.abel@inta.gob.ar

¹ Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

² INTA EEA Pergamino

Resumen

Las lentejas de agua son pequeñas plantas acuáticas flotantes que viven en aguas estancadas con materia orgánica en descomposición y pueden crecer y reproducirse extremadamente rápido, mientras consumen nutrientes del agua y acumulan almidón en su biomasa. Estas características las hacen excelentes candidatas para la depuración de efluentes y como sustrato para la fermentación. Su ubicuidad define un amplio banco de ecotipos. Nuestro objetivo fue evaluar el crecimiento, la eficiencia depuradora y el potencial fermentativo de ecotipos de especies de Lemna autóctonos de Argentina.

Se cultivaron 9 ecotipos en esterilidad, 25°C y 9000 lux, utilizando la mezcla de sales Schenk&Hildebrandt (0,5X, pH=6,5) como medio de cultivo, durante 7 y 14 días. Se partió de 20 ó 40 plantas por repetición (n=3), de los ecotipos de mayor y menor tamaño de fronda, respectivamente, para intentar homogeneizar la densidad inicial. Se midió la extracción de amonio (N-NH₄) y de fósforo reactivo soluble (PRS) del medio de cultivo, la tasa de crecimiento relativo (TCR) a partir del peso seco de la biomasa y la concentración de almidón como indicador del potencial fermentativo.

Los ecotipos presentaron diferencias en la TCR y en la concentración de almidón (3,3-11,2% almidón). La TCR varió en función de la densidad inicial describiendo una función logarítmica. La densidad inicial estuvo definida por el tamaño de fronda, el número inicial de plantas y el período de crecimiento (la densidad final de la primera semana fue la inicial de la segunda). La remoción de N-NH₄ fue proporcional a la producción de biomasa: 61 mg g⁻¹, y la de PRS fue independiente de la producción. A partir de estos resultados, planteamos como hipótesis que la variabilidad del crecimiento, estaría asociada a diferencias morfológicas entre los ecotipos y al efecto de la densidad.

Palabras clave: tasa de crecimiento relativo, nitrógeno, fósforo, almidón.

Introducción

Las lentejas de agua son pequeñas plantas acuáticas flotantes. Su hábitat natural es en aguas estancadas con materia orgánica en descomposición que provea un suministro constante de macro y micro nutrientes. Las especies de este grupo son capaces de crecer y reproducirse extremadamente rápido, mientras consumen nutrientes del agua y acumulan proteínas y almidón en su biomasa (Lam, Appenroth, Michael, Mori y Fakhoorian, 2014). Estas características las hacen excelentes candidatas para la biodepuración de efluentes con alto contenido de material orgánico acoplada a la utilización de la biomasa como sustrato para la fermentación láctica o alcohólica o como alimento para animales domésticos, peces e incluso humanos (Goopy y Murray, 2003; van der Spiegel, Noordam y van der Fels-Klerx, 2013; Xu, Cui, Cheng y Stomp, 2011).

La descarga de efluentes ricos en nutrientes hacia los cuerpos de agua causa eutrofización, lo que lleva a la proliferación de algas y disminución del oxígeno disuelto. La utilización de plantas acuáticas para recuperar nutrientes de las aguas residuales es una tecnología alternativa para convertir los nutrientes en productos potencialmente útiles y prevenir la contaminación del medio ambiente (Cheng, Bergmann, Classen, Stomp y Howard, 2002).

El desarrollo de sistemas de depuración incorporando el cultivo de lentejas de agua exige evaluar su crecimiento. El crecimiento de estas plantas está directamente afectado por la temperatura, el fotoperiodo, la densidad y la concentración de fósforo (P) y nitrógeno (N) del medio de cultivo (Frédéric, Samir, Louise y Abdelkrim, 2006; Lasfar, Monette, Millette y Azzouz, 2007).

Las lentejas de agua son monocotiledóneas de la familia botánica de las Lemnaceae y se agrupan en cinco géneros (*Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia*, *Wolffiella* y *Landoltia*) con 37 especies (Ziegler, Adelman, Zimmer, Schmidt y Appenroth, 2015). Se reproducen principalmente de manera vegetativa, de la parte basal de las frondes (órganos fotosintetizantes homólogos a la integración de tallo y hoja) emergen nuevas frondes que eventualmente se desprenden de la planta que les dio origen, de modo que forman poblaciones de plantas genéticamente uniformes. La ubicuidad de las lentejas de agua en el mundo define un amplio banco de ecotipos (especies adaptadas a distintos ambientes) con variabilidad en cuanto a su morfología, crecimiento y composición. El estudio de su potencial productivo contribuye para la selección del ecotipo apropiado para la producción de biomasa en un determinado ambiente.

Objetivo

Nuestro objetivo fue evaluar el crecimiento, la eficiencia depuradora y el potencial fermentativo de ecotipos de 4 especies de *Lemna* autóctonos de Argentina.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 9 ecotipos: *Lemna gibba* (50, 109 y 671), *Lemna valdiviana* (77 y 302), *Lemna minuta* (349 y 500), *Lemna aequinoctialis* (49) obtenidos de la colección del Rutgers Duckweed Stock Cooperative

(<http://www.ruduckweed.org/database.html>)

y uno (RF), cuya especie no fue identificada, que se obtuvo en lagunas de tratamiento de efluente en la localidad de Rosario de la Frontera (Salta). Se realizaron cultivos axénicos, en esterilidad, temperatura, radiación y fotoperiodo controlados (25 °C, 9000 lux y 12 hs) durante 7 y 14 días. Se utilizaron recipientes de vidrio de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo: una mezcla comercial de sales (0,5X Schenk & Hildebrandt) y sacarosa (1 g l⁻¹) ajustada a pH 6,5 con NaOH 0,1M. Para asegurar la reproducibilidad de los experimentos, los ecotipos se precultivaron en las condiciones anteriormente detalladas por dos semanas antes de comenzar los experimentos. Se inició el experimento con 20 o 40 plantas por repetición (n=3), de los ecotipos de mayor y menor tamaño

de fronda, respectivamente, para intentar homogeneizar la densidad inicial medida en g m⁻². Se incluyó un control sin plantas. Al comienzo del experimento y luego de 7 y 14 días de crecimiento, se midió la concentración de amonio (N-NH₄) y de fósforo reactivo soluble (PRS) del medio de cultivo. Luego de 7 y 14 días de crecimiento se midió la tasa de crecimiento relativo (TCR) por día y, al día 14, la concentración de almidón, como indicador del potencial fermentativo.

El PRS se determinó mediante el método colorimétrico del ácido ascórbico. El N-NH₄ se determinó mediante destilación y posterior titulación. Ambas determinaciones se analizaron dentro de las 48 horas posteriores al día de evaluación correspondiente, según la metodología de la American Public Health Association (APHA) (1989). La remoción de PRS y de N-NH₄ se calculó como la diferencia entre las concentraciones iniciales y finales.

La TCR se calculó a partir del peso seco (PS) de la biomasa usando la siguiente ecuación (Ziegler et al., 2015):

$$TCR = (\ln PS_{t_1} - \ln PS_{t_0}) / t_1 - t_0$$

y la producción se obtuvo como la diferencia entre la biomasa final y la inicial:

$$\text{Producción} = PS_{t_1} - PS_{t_0}$$

donde $t_0=0$ ó 7 días y $t_1=7$ ó 14 días, para las semanas 1 y 2, respectivamente.

El contenido de almidón se determinó mediante extracción con HCl y colorimetría con solución de Lugol (Appenroth, Krech, Keresztes, Fischer y Koloczek, 2010; Sree, Adelman, Garcia, Lam y Appenroth, 2015).

Se realizó un análisis de varianza con el software estadístico Infostat (Di Rienzo, Casanoves, Balzarini, González, Tablada y Robledo, 2010) para comparar la TCR y el porcentaje de almidón entre ecotipos. Antes, se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba Shapiro Wilks y, como el porcentaje de almidón evidenció falta de normalidad, se lo transformó mediante la función logaritmo en base 10. Se realizó la comparación múltiple de las medias mediante el test de Fisher ($\alpha=0,05$).

Resultados

Los ecotipos presentaron diferencias en la tasa de crecimiento relativo y en la concentración de almidón al día 14 (Figuras 1 y 2).

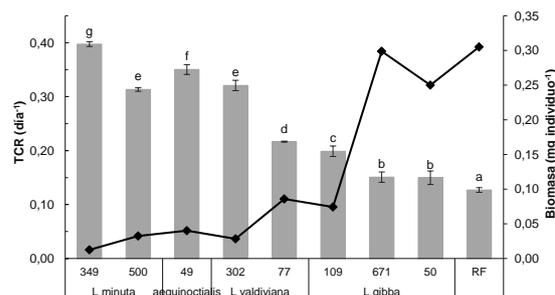


Figura 1. Tasa de crecimiento relativo durante la primera semana de experimento (entre los días 0 y 7) (barras) y biomasa individual (símbolos) de cada ecotipo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre ecotipos ($p<0,05$).

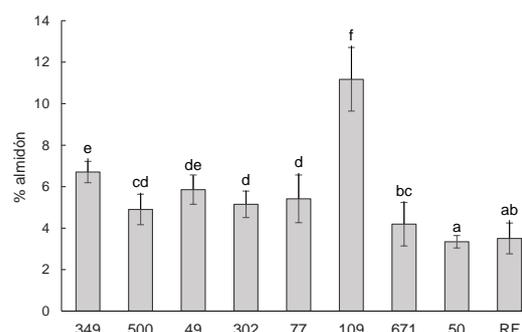


Figura 2. Porcentaje de almidón de los ecotipos evaluados luego de 14 días de crecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre ecotipos ($p<0,05$).

La TCR varió en función de la masa individual de cada ecotipo y de la densidad inicial describiendo una función logarítmica (Figura 3). La densidad inicial estuvo definida por el tamaño de fronda de cada ecotipo (biomasa individual), por el número de plantas sembradas al inicio

del experimento y por el período de crecimiento (la densidad final de la semana 1 fue la inicial de la semana 2).

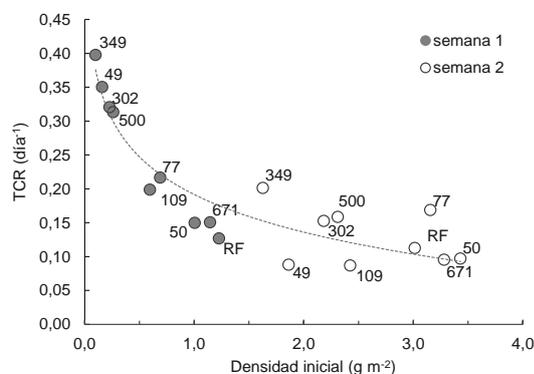


Figura 3. Relación entre la tasa de crecimiento relativo durante la primera y segunda semana de experimento (entre los días 0 y 7 y los días 7 y 14, respectivamente) y la densidad inicial. La densidad final luego de la primera semana de crecimiento fue la densidad inicial de la segunda semana de crecimiento.

$$Y = -0,08 \ln(x) + 0,19; R^2 = 0,87$$

La remoción de $N-NH_4$ fue directamente proporcional a la producción de biomasa: $61 \text{ mg } N-NH_4 \text{ g}^{-1}$ (producción en base seca) (Figura 4). La concentración inicial de $N-NH_4$ se redujo en promedio de 19 mg l^{-1} a 14 y a 6 mg l^{-1} luego de 7 y 14 días de crecimiento, respectivamente. La remoción de PRS no se relacionó con la producción de biomasa y fue de 40 mg l^{-1} a 35 mg l^{-1} luego de 7 días y no se modificó entre los días 7 y 14.

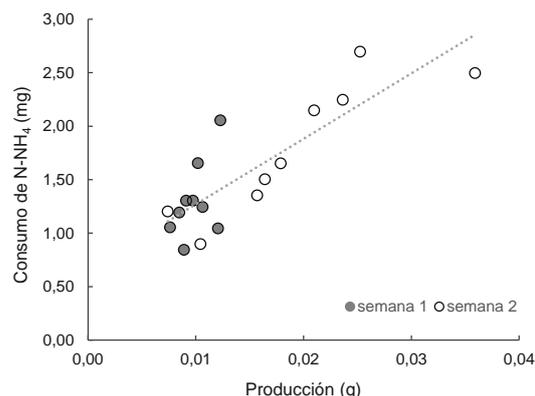


Figura 4. Relación entre la extracción de $N-NH_4$ del medio de cultivo y la producción de biomasa semanal (cada punto representa un ecotipo). El modelo es: consumo de $N-NH_4$ (mg) = $61 * \text{producción (g)} + 0,66$; $R^2 = 0,71$

Discusión

Las lagunas de estabilización, constituyen el tratamiento de efluentes más comúnmente utilizado para pequeñas comunidades en Latinoamérica. Consiste en mantener el efluente en lagunas por un período lo suficientemente prolongado como para lograr, a través de un proceso natural, la estabilización de la materia orgánica y sedimentación de los sólidos en suspensión (tratamiento primario). A veces, los efluentes que salen de la laguna de estabilización pasan por dos o tres lagunas más para eficientizar la disminución del contenido orgánico (tratamiento secundario) (Piérart y Rojas, 2013). En las lagunas de tratamiento secundario la materia orgánica del efluente es parcialmente removida o

transformada en moléculas orgánicas sencillas y en compuestos inorgánicos que pueden ser absorbidos directamente por plantas como las lentejas de agua (tratamiento terciario).

La alta tasa de multiplicación de las lentejas de agua y el alto contenido de proteínas de su biomasa permiten eficientizar la depuración del efluente, ya sea para la reutilización del agua tratada o para reducir la eutrofización de los cursos de agua donde se vierte el efluente tratado, y la recuperación (captación) de los nutrientes presentes en el efluente a través de la cosecha de la biomasa producida.

El éxito de los sistemas de tratamiento de efluente que incorporan lentejas de agua depende, entre otras cosas, del rendimiento vegetal. Altos rendimientos resultan en una eficiente remoción de N y P (Frédéric et al., 2006). En este trabajo, encontramos una relación directa entre la productividad de los ecotipos evaluados y la remoción de N-NH₄ del medio de cultivo, pero no encontramos relación entre la productividad y la remoción de P.

Las lentejas de agua absorben N preferentemente en forma de NH₄, que es la forma nitrogenada predominante en efluentes cloacales o de producciones animales intensivas (Caicedo, van der Steen, Arce y Gijzen, 2000; Porath y Pollock, 1982). Según Lasfar et al. (2007),

concentraciones inferiores a 1 mg P l⁻¹ y a 3 mg N l⁻¹ y superiores a 20 mg P l⁻¹ y 120 mg N l⁻¹, inhiben la TCR de *Lemna minor*. Sin embargo, Caicedo et al. (2000) encontraron que concentraciones de amonio (NH₃ + NH₄) mayores a 20 mg l⁻¹ inhiben el crecimiento de *Spirodela polyrrhiza*. Estas diferencias podrían estar asociadas a las formas nitrogenadas del medio de cultivo utilizado. Asumiendo que en nuestros experimentos todo el N-NH₄ removido del medio de cultivo fue absorbido por las lentejas de agua y que no hubo pérdidas, el contenido de N de las plantas sería de 6% (equivalente a 36% proteína), que es acorde con lo reportado en la bibliografía (Goopy y Murray, 2003).

Para poder acoplar el proceso de depuración con lentejas de agua con la producción de etanol o ácido láctico a partir de la fermentación, es necesario producir biomasa vegetal de alto contenido de almidón. La acumulación de almidón es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento y al contenido de N y P (Xiao, Fang, Jin, Zhang y Zhao, 2013). Por este motivo, varios autores han explorado tratamientos tendientes a inhibir el crecimiento (por ejemplo, estrés por salinidad y bajas concentraciones de nutrientes) como alternativas para aumentar la acumulación de almidón (Sree et al., 2015; Xiao et al., 2013). En nuestro trabajo, los ecotipos evaluados

presentaron distintos contenidos de almidón aunque estas variaciones no estuvieron asociadas con la variación en la tasa de crecimiento.

Los valores de crecimiento reportados en la bibliografía son muy variables, aun habiendo utilizado condiciones de temperatura, fotoperiodo y concentración de nutrientes similares. Estas diferencias pueden ser explicadas, en alguna medida, por diferencias en densidades iniciales utilizadas por los diferentes autores ya que la TCR de las lentejas de agua depende de la densidad inicial del cultivo. La TCR disminuye a medida que aumenta la densidad, y la producción aumenta hasta una densidad óptima y luego disminuye (Frédéric et al., 2006).

En nuestro trabajo, utilizar un número fijo de plantas para definir la densidad inicial de los experimentos hubiera generado valores dispares de densidad expresada en biomasa por unidad de superficie, ya que el tamaño de frondas es dispar entre ecotipos. En un intento por homogeneizar la densidad inicial, utilizamos 20 plantas en el caso de los ecotipos de mayor tamaño de fronda (49, 50, 671, RF) y 40 plantas en el caso de los de menor tamaño (77, 109, 302, 349, 500). Sin embargo, este procedimiento no fue suficiente para lograr una densidad inicial homogénea al inicio del experimento (día 0) ni al inicio de la segunda semana de crecimiento (día 7). Como consecuencia,

es válido preguntarnos si las diferencias de crecimiento medidas tienen relación con los ecotipos, con las distintas densidades iniciales utilizadas o con ambos.

Kutschera y Niklas (2001) plantean que las lemnas constituyen un ejemplo del compromiso que existe entre el tamaño de los individuos y su tasa de crecimiento vegetativo. En este sentido, nosotros observamos que el aumento del tamaño individual de los ecotipos evaluados fue inversamente proporcional a sus tasas de crecimiento. De modo que, planteamos como hipótesis que la variabilidad registrada en el crecimiento, y la reportada anteriormente por Ziegler et al. (2015) para diferentes ecotipos, estarían asociadas a diferencias morfológicas (biomasa de cada individuo) entre los ecotipos (Kutschera y Niklas, 2015; Niklas y Enquist, 2001) y al efecto de la densidad sobre la TCR descrito por Frédéric et al. (2006) para un material genéticamente homogéneo. En futuros experimentos avanzaremos sobre este interrogante.

Conclusiones

En este trabajo encontramos diferencias en la tasa de crecimiento y en la concentración de almidón de 9 ecotipos de Lemna autóctonos de Argentina. La TCR varió en función de la masa individual de cada ecotipo y de la

densidad inicial. Las lentejas de agua modificaron el medio de cultivo en el que crecieron, redujeron las concentraciones de N-NH₄ y de PRS. La remoción de N-NH₄ fue directamente proporcional a la producción de biomasa, mientras que la remoción de PRS no se relacionó con la productividad.

Bibliografía

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Pollution Control Federation (WPCF) (1989). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Madrid, España: Editorial Díaz de Santos. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/288385775/Metodos-normalizados-para-el-analisis-de-aguas-potables-y-residuales>

Appenroth, K. J., Krech, K., Keresztes, Á., Fischer, W., & Koloczek, H. (2010). Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere*, 78(3), 216-223. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.007>

Caicedo, J. R., van der Steen, N. P., Arce, O., & Gijzen, H. J. (2000). Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rates of duckweed (*Spirodela polyrrhiza*). *Water Research*,

34(15), 3829-3835. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00128-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00128-7)

- Cheng, J., Bergmann, B. A., Classen, J. J., Stomp, A. M., & Howard, J. W. (2002). Nutrient recovery from swine lagoon water by *Spirodela punctata*. *Bioresource technology*, 81(1), 81-85. doi: 10.1016/s0960-8524(01)00098-0
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; González, L.; Tablada, M. & Robledo, C.W. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Frédéric, M., Samir, L., Louise, M., & Abdelkrim, A. (2006). Comprehensive modeling of mat density effect on duckweed (*Lemna minor*) growth under controlled eutrophication. *Water Research*, 40(15), 2901-2910. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.05.026>
- Goopy, J. P., & Murray, P. J. (2003). A review on the role of duckweed in nutrient reclamation and as a source of animal feed. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(2), 297-305.
- Kutschera, U., & Niklas, K. J. (2015). Darwin-Wallace Demons: survival of the fastest in populations of duckweeds and the evolutionary history of an enigmatic group of angiosperms. *Plant Biology*, 17, 24-32.

- Lam, E., Appenroth, K., Michael, T., Mori, K., & Fakhoorian, T. (2014). Duckweed in bloom: the 2nd International Conference on Duckweed Research and Applications heralds the return of a plant model for plant biology. *Plant Molecular Biology*, 84(6), 737-742. doi: 10.1007/s11103-013-0162-9
- Lasfar, S., Monette, F., Millette, L., & Azzouz, A. (2007). Intrinsic growth rate: A new approach to evaluate the effects of temperature, photoperiod and phosphorus–nitrogen concentrations on duckweed growth under controlled eutrophication. *Water Research*, 41(11), 2333-2340. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.059>
- Niklas, K. J., & Enquist, B. J. (2001). Invariant scaling relationships for interspecific plant biomass production rates and body size. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2922-2927.
- Piérart, I. P., & Rojas, G. C. (2013). Modelo integrado de un sistema de biodepuración en origen de aguas residuales domiciliarias. Una propuesta para comunidades periurbanas del centro sur de Chile. *Revista Gestión y Ambiente*, 16(3), 39-51.
- Porath, D., & Pollock, J. (1982). Ammonia stripping by duckweed and its feasibility in circulating aquaculture. *Aquatic Botany*, 13, 125-131. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(82\)90046-8](https://doi.org/10.1016/0304-3770(82)90046-8)
- Sree, K. S., Adelman, K., Garcia, C., Lam, E., & Appenroth, K.-J. (2015). Natural variance in salt tolerance and induction of starch accumulation in duckweeds. *Planta*, 241(6), 1395-1404. doi: 10.1007/s00425-015-2264-x
- van der Spiegel, M., Noordam, M. Y., & van der Fels-Klerx, H. J. (2013). Safety of Novel Protein Sources (Insects, Microalgae, Seaweed, Duckweed, and Rapeseed) and Legislative Aspects for Their Application in Food and Feed Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(6), 662-678. doi: 10.1111/1541-4337.12032
- Xiao, Y., Fang, Y., Jin, Y., Zhang, G., & Zhao, H. (2013). Culturing duckweed in the field for starch accumulation. *Industrial Crops and Products*, 48(0), 183-190. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.017>
- Xu, J., Cui, W., Cheng, J. J., & Stomp, A.-M. (2011). Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol. *Biosystems Engineering*, 110(2), 67-72. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2011.06.007>
- Ziegler, P., Adelman, K., Zimmer, S., Schmidt, C., & Appenroth, K. J. (2015). Relative in vitro growth rates of

duckweeds (Lemnaceae) – the most rapidly growing higher plants. *Plant Biology*, 17(s1), 33-41. doi: 10.1111/plb.12184

Agradecimientos

Agradecemos al Rutgers Duckweed Stock Cooperative que donó los ecotipos utilizados.

Financiamiento

Este trabajo fue subsidiado por: Mamagrande, a través de un proyecto del Fondo Argentino Sectorial “Generación de productos de alto valor agregado a partir de biomasa acuática con alto contenido de almidón proveniente de lagunas de tratamientos de efluentes del NOA, LemnaBio”, un Proyecto de Vinculación Tecnológica “Universidades Agregando Valor” de la Secretaría de Políticas Universitarias (2869/2016 “Biotransformación de Efluentes”) y un Subsidio de Investigación Bianual de la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (0175/2017 “Depuración de efluentes con lentejas de agua (subfamilia Lemnoideae) con potencial fermentativo”).