

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

UNIVERSITAS Miguel Hernández

FITORREMEDIACIÓN DE AGUAS MEDIANTE EL EMPLEO DE HIDRÓFITOS

TRABAJO FIN DE GRADO

JUNIO 2018

AUTOR: Alejandro Cantó Richarte

TUTORES: Ignacio Meléndez Pastor y María Isabel Mira Martínez

Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente

Área de Ingeniería Química

Título: Fitorremediación de aguas mediante el empleo de hidrófitos.

Resumen: La depuración de las aguas residuales mediante el empleo de plantas es una línea de investigación muy importante, dado que la fitorremediación es capaz de depurar aguas, sin necesidad de recurrir a sustancias químicas y además pudiendo generar biomasa vegetal con posibles usos adicionales. Por ello, este trabajo se basa en estudiar la capacidad de la lenteja de agua para eliminar nutrientes (nitratos y fosfatos) del medio y determinar sus tasas de producción de biomasa y carbono orgánico. Se realizaron una serie de experimentos de cultivo de lenteja de agua en condiciones controladas, que permitieron observar el comportamiento de estos organismos a diferentes dosis de nitratos y fosfatos, en diferentes periodos de tiempo.

Los resultados obtenidos en los análisis revelan diferencias significativas en cuanto a clorofilas, biomasa (fresca y seca), pH y conductividad eléctrica dependiendo del tipo y concentración de nutriente. Además, se observaron diferencias significativas debidas a la evaporación, donde se observa que las muestras que contienen planta muestran una tasa de eliminación de agua ligeramente superior (7-8%), si bien el contenido en agua de la biomasa fresca resulta superior al 94%. Como conclusión, el cultivo de lentejas de agua para el tratamiento/afinado de aguas residuales es una tecnología eficaz, cuyo empleo puede ser extendido al ser un sistema de depuración más económico y sostenible.

Palabras clave: Lenteja de agua, nitratos, fosfatos, clorofilas, biomasa.

Title: Phytoremediation of water by using hydrophytes.

Abstract: The purification of wastewater with plants is a very important line of research, since phytoremediation is capable of purifying water, without the need for chemical substances and it is able to generate biomass with possible additional uses. Therefore, this work is based on studying the ability of the duckweed to remove nutrients (nitrates and phosphates) from the environment and determine the production rates of biomass and organic carbon. A series of experiments were conducted to cultivate duckweed under controlled conditions, which allowed to observe the behaviour of these organisms in different doses of nitrates and phosphates, at different times.

The results obtained from the analyses show significant differences in terms of chlorophyll, biomass (fresh and dry), pH and electrical conductivity depending on the type and concentration of nutrient. In addition, significant differences were observed due to evaporation. The samples containing plant show a slightly higher rate of water removal (7-8%), although the water content of the fresh biomass was 94%. In conclusion, the cultivation of duckweed for the treatment of wastewater is an effective technology, the use of which can be more economical and sustainable.

Keywords: Duckweed, nitrates, phosphates, chlorophylls, biomass.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación no se habría podido realizar sin la colaboración de la Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales de la Generalitat Valenciana (EPSAR), por facilitarnos la recogida de las plantas de la depuradora de Aspe, así como a la Sociedad de Fomento Agrícola Castellonense S.A. (FACSA), empresa gestora de la depuradora.

Al Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente por facilitar los medios necesarios para desarrollar este trabajo.

A mis tutores Ignacio Meléndez Pastor y María Isabel Mira Martínez por su dedicación. A María Belén Almendro Candel por su ayuda el trabajo en el laboratorio. A José Navarro Pedreño e Ignacio Gómez Lucas por diseño y puesta en marcha del experimento.

A Israel Hernández González, amigo y compañero, por la colaboración y su aportación desde el principio de este trabajo.

Por último, agradecer a mi familia por el apoyo recibido durante estos años.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. ¿CÓMO SERÍA LA PLANTA IDEAL PARA LA CAPTURA DE NUTRIENTES DE AGUAS RESIDUALES?	5
1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA	6
1.3. DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT.....	7
1.4. CICLO DE VIDA.....	8
1.5. VENTAJAS DE LA LENTEJA DE AGUA	8
1.6. REQUERIMIENTOS DE LA LENTEJA DE AGUA.....	10
1.7. NUTRIENTES LIMITANTES: EL PAPEL DE NITRATOS Y FOSFATOS EN LOS CICLOS BIOGEOQUÍMICOS.....	12
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. ACLIMATACIÓN	16
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	18
3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE AGUAS	21
3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE MATERIAL VEGETAL.....	23
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. FASE I. CARACTERIZACIÓN GENERAL DEL MATERIAL VEGETAL PROCEDENTE DE LA EDAR.....	25
4.2. FASE II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	26
4.3. FASE II. ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES DEL AGUA.....	27
4.4. FASE II. DESARROLLO VEGETAL Y ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES DEL AGUA	30
5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA.....	37
6. REFERENCIAS	38
6.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
6.2. RECURSOS DE INTERNET	40

1. INTRODUCCIÓN

La lenteja de agua es una planta que puede ser utilizada para la recuperación de nutrientes en las aguas residuales [1]. Debido a su rápido crecimiento, las lentejas de agua son la elección principal de la vegetación acuática en múltiples lagunas y humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales [2]. Los motivos por lo que las lentejas de agua son plantas muy adecuadas para la fitodepuración, se deben a sus altas tasas de asimilación de nutrientes y desarrollo de biomasa. Mediante esta introducción se pretende aportar información relevante sobre las características fundamentales que sustentan la elección de las lentejas de agua para el tratamiento de aguas residuales.

1.1. ¿Cómo sería la planta ideal para la captura de nutrientes de aguas residuales?

En los últimos años surgieron tecnologías basadas en el empleo de organismos vivos para descontaminar suelos y recuperar los ecosistemas afectados. Cuando estas tecnologías se basan en el uso de plantas, reciben el nombre de fitorremediación. Se define como el uso de plantas verdes para eliminar los contaminantes del entorno o para reducir su peligrosidad. Este tipo de tecnologías reúne un gran número de ventajas, facilidad de manejo y reducido coste, ya que no se utilizan reactivos químicos peligrosos ni afectan negativamente al ecosistema. [3]. En este sentido, la planta ideal para la captura de nutrientes de aguas residuales sería una planta acuática debido a que el hábito de crecimiento acuático proporciona varias ventajas tales como [1]: a) alta tasa de crecimiento con mínimos aportes de nutrientes; b) tolerar la variación de niveles de nutrientes; c) no ser una planta exótica invasora; y d) cosechas múltiples por año.

A diferencia de las plantas terrestres, las plantas acuáticas son preferibles porque pueden absorber directamente los nutrientes de las aguas residuales y no compiten con los cultivos por las tierras agrícolas [4]. La utilización de aguas residuales para el sistema de cultivo proporcionaría agua y nutrientes, evitando de nuevo la competencia por el agua de riego y los fertilizantes necesarios para cultivos basados en el suelo. La planta ideal podría tolerar la variación de los niveles de nutrientes en las aguas residuales y las diversas formas de nitrógeno que pueden estar presentes, como por ejemplo las altas concentraciones de amoníaco que se encuentran en algunas aguas residuales.

Además, debería tener una tasa de crecimiento rápida y ser capaz de alcanzar dicha tasa de crecimiento con un mínimo de aportes de nutrientes. La planta también proporcionaría cosechas múltiples por año y no sería una especie exótica invasora. Las características de la planta deberían proporcionar ventajas para la mecanización de la cosecha y posterior manipulación. El componente

del producto objetivo debería ser consistente en calidad y cantidad, y ser estable bajo condiciones de almacenamiento de biomasa. Para minimizar los costos de manipulación y transporte después de la cosecha de biomasa, la biomasa debe ser fácilmente susceptible de secado rápido, con un mínimo de energía.

A continuación, se presentarán las características de la planta estudiada y podremos observar que cumple todas las características que tendría una planta ideal para el estudio de captura de nutrientes en aguas.

1.2. Características de la planta

Las lentejas de aguas son planta angiosperma (plantas con flores), monocotiledónea, perteneciente a la familia *Lemnaceae* [5]. En esta familia se diferencian 37 especies distribuidas en 5 géneros: *Landoltia*, *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* y *Wolffiella* [6]. Los géneros difieren en el tamaño y la complejidad de las frondas y en el número de raíces que tienen [7].

Son plantas acuáticas pequeñas y frágiles [8] que flotan en aguas tranquilas [7]. En *Lemna sp.*, las raíces están generalmente presentes y varían de 2 a 21 por fronda. En general, el cuerpo de la planta se compone de frondas con o sin raíces. Las frondas son poco diferenciadas y aplastadas, tienen forma de hoja pequeña o esférica [9] y, cuando está presente, una o dos flores [1]. Algunas especies desarrollan estructuras parecidas a las raíces de color blanco que estabilizan la planta o la ayudan a obtener nutrientes [8]. El tamaño estándar es de 0,05 a 1,5 cm de largo (sin tallo) y 0,03 a 1 cm de ancho. Las raíces están alineadas en la base y no poseen pilosidades. [9]. Es una de las especies de angiospermas más pequeñas que existen en el reino de las plantas [5]. Los principales constituyentes celulares son del tipo clorenquimatoso (tejido clorenquimático) con grandes espacios intercelulares. Esto ayuda a proporcionar flotabilidad y apoya la naturaleza flotante libre. [9].

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. El periantio está ausente. Las flores nacen de una hendidura ubicada en el borde de la hoja, dentro de una bráctea denominada espata, muy común en las especies del orden arales. El fruto contiene de 1 a 4 semillas [5].

La forma más común de reproducción es la asexual por gemación. En los bordes basales se desarrolla una yema pequeña que origina una planta nueva que se separa de la planta progenitora [5], por lo que las hojas hijas se desprenden de una o dos bolsas en las frondas de la madre, permaneciendo unidas durante un tiempo para formar colonias [7]. La lenteja de agua crece más rápido que la mayoría

de las otras plantas y puede duplicar su biomasa cada 16-24 h en condiciones ambientales apropiadas [6].

1.3. Distribución y hábitat

La familia *Lemnaceae* tiene una distribución mundial (excepto en las zonas árticas y antárticas), pero la mayor diversidad de especies es en las áreas subtropicales o tropicales [8]. Se encuentran principalmente en charcos de agua dulce, ciénagas, lagos y ríos calmados [5].

La lenteja de agua se adapta a una amplia variedad de zonas geográficas y climáticas. Pueden crecer en aguas salobres (aunque no concentran los iones de sodio en su crecimiento) y también cuerpos de agua eutróficos (con altas tasas de crecimiento). En comparación con otras plantas acuáticas, la lenteja de agua es menos sensible a las fluctuaciones del pH, el daño causado por plagas y enfermedades y tiene una alta capacidad de recuperación de nutrientes. Además, la lenteja de agua es adaptable a diferentes fuentes de material de desecho como efluentes de biogás, estiércol animal, basura urbana y residuos, convirtiéndola así en una especie potencialmente adecuada para la recuperación de nutrientes. [10]. Su amplio rango geográfico significa que una cepa nativa de esta especie se puede utilizar para establecer un sistema de tratamiento de aguas residuales en casi cualquier ubicación global, evitando así el uso de una especie exótica invasora [1].

La planta puede desarrollarse en un rango amplio de temperaturas, que varía entre 5 y 30°C, con un crecimiento óptimo entre 15 y 18°C. Se adapta bien a cualquier condición de iluminación. Crece rápidamente en partes calmadas y ricas en nutrientes (N y P). El Fe es un elemento limitante para su adecuado desarrollo. Pueden además tolerar un rango de pH amplio, siendo el óptimo entre 4,5 y 7,5 [5].

Para resistir las condiciones desfavorables y la etapa de dormancia del ciclo de vida, se forman "turions". Son frondas compactas de tamaño y estructura reducidas y rellenas con granos de almidón o turín [9], lo que las hace más densas que las frondas. Así pues, se hunden en el fondo y se incrustan en el barro seco para pasar las condiciones desfavorables [8], como por ejemplo la inanición de nutrientes y/o las temperaturas bajas [6]. Otro mecanismo para persistir las condiciones desfavorables es la floración a fines de verano [8].

Las esteras de lenteja de agua albergan una gran variedad de fauna pequeña que se alimenta, pone huevos o se refugia en medio de las plantas [11]. Sus principales depredadores son [8]: a) peces herbívoros (carpa); b) caracoles; c) platelmintos; d) patos y otras aves (pocas); e) rata almizclera; y f) cerdos y rumiantes.

1.4. Ciclo de vida

Según [8], el crecimiento vegetativo en *Lemna minor* (una de las especies más frecuentes en nuestras latitudes) exhibe ciclos de senescencia y rejuvenecimiento bajo constante disponibilidad de nutrientes y condiciones climáticas consistentes (Figura 1).



Figura 1. Gráfico del ciclo de vida de la lenteja de agua. Fuente: elaboración propia

El ciclo de senescencia y rejuvenecimiento se ve incrementado por las altas temperaturas, a través de una disminución en la duración de la fronda. Esto tiene repercusiones, ya que habrá un patrón de crecimiento cíclico si las plantas provienen de una sola colonia y tienen todas las mismas edades. En condiciones naturales, es posible ver una estera de lentejas de agua aparentemente disminuida y explotar en los patrones de crecimiento.

Los cambios cíclicos parecen estar mediados por las sustancias químicas secretadas por la fronda madre y los patrones de crecimiento pueden modificarse en gran medida mediante métodos de cosecha que mezclan agua, efectos del viento y refugio, así como la intensidad de luz y la temperatura.

Los fenómenos de senescencia cíclica y rejuvenecimiento pueden causar considerables errores de interpretación en estudios que examinan, por ejemplo, la respuesta de unas pocas plantas a diferentes fuentes de nutrientes en periodos de tiempo cortos.

1.5. Ventajas de la lenteja de agua

La lenteja de agua presenta muchas ventajas por las que la podemos reconocer como planta modelo:

- Alta tasa de absorción de nutrientes [6]. Pueden desarrollarse con niveles relativamente altos de N, P y K, concentrando los minerales y sintetizando las proteínas [8]. Debido a su tolerancia a los altos niveles de nutrientes y a su excelente capacidad de absorción de estos, la lenteja de agua ha sido ampliamente estudiada en el tratamiento terciario de aguas residuales municipales e industriales, así como en la recuperación de nutrientes de aguas residuales porcinas [6].
- Alto rendimiento de biomasa [6]. Asimilan nutrientes en una biomasa de alta calidad que puede tener un valor económico. Esto contrasta favorablemente con la costosa nitrificación-desnitrificación en la que el nitrógeno se convierte en N₂ atmosférico y, por lo tanto, se "perderá" para su posterior reutilización [12]. Además, presenta un alto potencial como recurso de alimentación para el ganado [8].
- Gran potencial como material alternativo para la producción de combustible etanol, butanol y biogás. La producción de biogás está asociada al empleo de lentejas de agua para el tratamiento de aguas residuales, especialmente para la eliminación de nutrientes [6]. Las peculiaridades estructurales y características químicas como 17,6-35% en carbohidratos, 21-38% de almidón, 16-41,7% de proteína cruda o 4,5-9% de lípidos, hacen que la lenteja de agua sea de gran utilidad para operaciones de energía basadas en biomasa [9].
- Capacidad de concentrar minerales en aguas muy contaminadas [8]. El uso de la lenteja de agua sugiere una opción de bajo coste para la purificación del agua residual y una producción simultánea de biomasa. Debido a la absorción eficiente de metales pesados y posiblemente otros compuestos tóxicos, la lenteja de agua se debe cultivar utilizando efluentes con bajas concentraciones de dichos compuestos [12].
- La lenteja de agua tiene una alta productividad, alto contenido en proteínas, bajo contenido de fibras, fácil manejo, cosecha y procesamiento y un extenso período de crecimiento [13].
- Como un subproducto del tratamiento de aguas residuales, la lenteja de agua se puede utilizar para diferentes aplicaciones. La lenteja de agua tiene un alto contenido de proteína, por lo que es un material excelente para la alimentación de animales, aves y peces. Investigaciones recientes han encontrado que la lenteja de agua puede ser una buena materia prima para la producción de almidón y, finalmente, para la generación de etanol combustible [1].
- Las lentejas de agua viven en la naturaleza en asociación con muchas otras formas de vida acuática, incluidos peces, crustáceos, insectos, algas y bacterias. La relación de las lentejas de agua con estas otras plantas y formas de vida en términos de remediación del agua y toxicidad será evidente [7].

- Dado que es una especie flotante y de buen crecimiento, puede cubrir rápidamente la superficie de los cuerpos de agua donde se encuentra e impedir el paso de la luz inhibiendo el crecimiento de otros organismos fotosintéticos. La cobertura de plantas flotantes como *Lemna minor* reduce las probabilidades 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 de eutrofización [5].

1.6. Requerimientos de la lenteja de agua

El crecimiento y composición química de la lenteja de agua dependen múltiples factores [8]:

Concentración de minerales en el agua y su tasa de reposición.

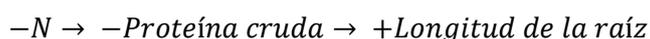
Generalmente las lentejas de agua son capaces de asimilar gran cantidad de minerales. Sin embargo, altos niveles de minerales pueden deprimir el crecimiento o eliminar las lentejas de agua que crecen mejor en aguas poco mineralizadas.

- Requisitos de nitrógeno.

El ion amonio NH_4^+ parece ser la fuente de N más útil.



El rápido crecimiento de la lenteja de agua también se asocia con una alta acreción de proteínas y bajo contenido en fibras. El contenido en fibra aumenta cuando se produce el crecimiento de la raíz.



- Requisitos de fósforo.

Las lentejas de agua parecen concentrar P hasta aproximadamente un 1,5% de su peso seco y, como tales, pueden crecer en aguas con alto contenido de P siempre que se mantengan las concentraciones de N. Por otro lado, el P en la planta parece ser altamente soluble y se libera rápidamente al medio al morir la planta.

- Requisitos de potasio.

Cuando se satisfacen otros requisitos minerales, tan solo una concentración baja de potasio es necesaria para que la planta pueda crecer correctamente.

- Requisitos de azufre.

Es posible que los niveles de S a veces limiten el crecimiento o la acreción de proteínas, debido al alto nivel de S-aminoácidos en la planta cuando la tasa de crecimiento es alta y el NH_4^+ en el medio no es limitante.

- Acumulación de metales pesados.

Todos los miembros de la familia de las lentejas de agua concentran metales pesados. Son capaces de captar y concentrar Cd, N, Cr, Zn, Sr, Co, Fe, Mn, Cu, Pb, Al e incluso Au. Los efluentes provenientes de la industria o la minería que contienen altas concentraciones de metales pesados, hacen que las plantas lleguen a intoxicarse.

¿Cómo reunir los requisitos minerales de la lenteja de agua?

Existen diferentes formas de poder reunir los requerimientos para el correcto crecimiento de la planta, algunos de ellos son:

- ❖ Fertilizantes.
- ❖ Estiércol y biogás. Efluente de pH neutro y concentraciones de amoníaco muy altas.
- ❖ Sistemas misceláneos: Limpiar aguas residuales de la contaminación mineral y producir materia prima de biomasa.
- ❖ Aguas residuales: Eliminar el P de las aguas residuales humanas.

Profundidad del agua.

La profundidad del agua requerida en condiciones cálidas es mínima. Existen problemas en estanques poco profundos tanto en climas fríos como cálidos donde la temperatura puede moverse rápidamente por debajo o por encima del crecimiento óptimo. Para obtener una concentración alta de nutrientes y mantener bajas temperaturas para una tasa de crecimiento óptima prolongada, se debe establecer un equilibrio entre el volumen y el área de superficie.

pH del agua.

Sobrevive a pH entre 5 y 9, pero crece mejor en el rango 6,5 y 7,5. Un pH alto da como resultado una solución de amoníaco que puede ser tóxica y también puede perderse por volatilización. De acuerdo con [14], pH superior a 8, el amonio se transforma en amoníaco gaseoso, que es tóxico para la lenteja de agua. Altas concentraciones de NH_4^+ podrían dar como resultado la despolarización de la membrana de la planta, dando como resultado una inhibición general del transporte de aniones y el crecimiento de la lenteja de agua [10].

Temperatura del agua.

Crecen entre 6 y 33°C. La tasa de crecimiento aumenta con la temperatura, pero hay un límite superior alrededor de 30°C donde el crecimiento disminuye.

Incidencia de luz solar y duración del día.

La fotosíntesis es la principal fuente de producción de biomasa en plantas. Las plantas reúnen eficientemente la energía de la luz cuando la intensidad de la luz es baja, pero también deben disipar la energía de excitación cuando la absorción de fotones excede la capacidad de las plantas para la fotosíntesis. En condiciones de mucha luz, las plantas pueden absorber el exceso de energía de la luz, lo que puede provocar daños en el fotosistema. Las altas tasas de daño (aquellas que exceden la tasa de reparación) causarán una reducción de la eficiencia fotosintética [15].

El fotoperiodo es otro factor importante para el crecimiento de las plantas. Los efectos del fotoperiodo en las plantas contienen dos aspectos. En primer lugar, el fotoperiodo es una señal para muchos procesos en el crecimiento de las plantas, incluida la detección de la señal luminosa en las hojas, el arrastre de los ritmos circadianos y la producción de una señal móvil que se transmite por toda la planta. En segundo lugar, un fotoperiodo más largo puede contribuir a un mayor aporte de energía lumínica y un tiempo de fotosíntesis más prolongado, lo que da como resultado una mayor producción de fotosintato, lo que conduce a la mejora del crecimiento y desarrollo de las plantas [15].

1.7. Nutrientes limitantes: el papel de nitratos y fosfatos en los ciclos biogeoquímicos

Entre los elementos nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas acuáticas, el nitrógeno y el fósforo son frecuentemente considerados los más limitantes, porque los requisitos son altos en relación con la disponibilidad [16]. En este sentido, resultan de especial relevancia las concentraciones de nitratos y fosfatos disueltos en el medio acuático, dado que un aumento de sus concentraciones conduce a condiciones eutróficas de los cuerpos de agua. A continuación, se presentan algunos detalles sobre el papel de ambos compuestos en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y fósforo.

Nitratos

El crecimiento de las plantas a menudo aumenta en respuesta al aumento de las concentraciones de nitrógeno, porque la escasez de nitrógeno disponible es un factor limitante en muchos ecosistemas acuáticos. En la mayoría de los casos, sin embargo, la adición de nitrógeno a los cuerpos de agua se

considera contaminación de nutrientes, porque puede contribuir a las floraciones densas de fitoplancton, es decir, causar eutrofización [17]. En los tejidos vivos, el nitrógeno es una parte integral de las enzimas, que median las reacciones bioquímicas en las que se reduce el carbono (es decir, fotosíntesis) u oxidado (respiración) [18]. Por lo tanto, observando la figura 2 la adición de nutrientes nitrogenados como los nitratos en el medio donde habite la lenteja de agua, provocará una mayor tasa fotosintética y, a su vez, un incremento de la materia orgánica, es decir, más biomasa.

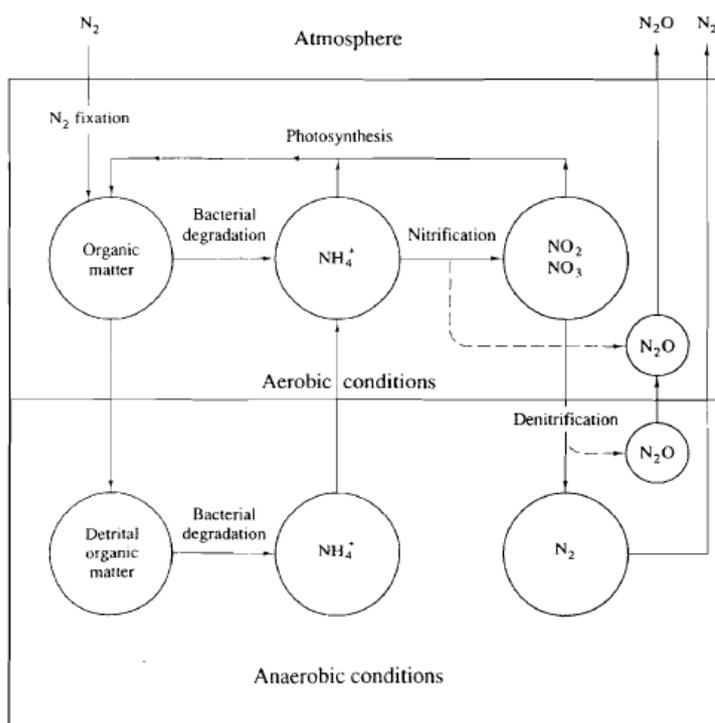
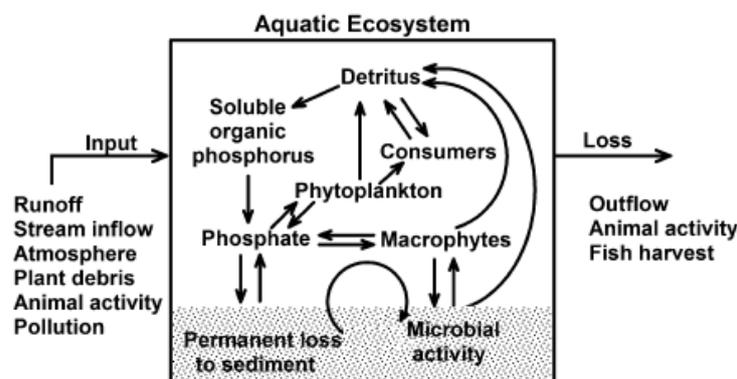


Figura 2. Ciclo del nitrógeno. Fuente: Schlesinger, 1997.

Fosfatos

Las plantas macrófitas pueden capturar muy rápidamente el fósforo del agua en forma de fosfatos solubles. La absorción de la planta es un factor principal que controla las concentraciones de este nutriente en el agua. Así pues, las comunidades de macrófitas pueden almacenar grandes cantidades de fósforo en su biomasa [17]. El fósforo es un componente esencial del ADN, el ATP y las moléculas de fosfolípidos de las membranas celulares [18]. En la Figura 3 se aprecia cómo las macrófitas son



capaces de captar los fosfatos del medio acuático y almacenarlos en sus tejidos o transformarlos hasta que la actividad microbiana actúe o se pierda permanentemente en los sedimentos del suelo.

Figura 3. Ciclo del fósforo en ecosistemas acuáticos. Fuente: Boyd [17]

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Según Ziegler *et al.* [7], *L. minor* se propuso en 1979 como una macrófita acuática "representativa" para evaluar la seguridad ambiental de los productos químicos. Sobre la base de la experiencia en las pruebas de toxicidad de la planta hasta finales de la década de 1980, varios organismos nacionales e internacionales han recomendado métodos de prueba de lenteja de agua. Además, Ishizawa *et al.* [19] afirman que durante décadas, la lenteja de agua fue considerada como una planta industrialmente versátil que podría ser utilizada como fertilizante orgánico para alimentación animal y como prueba de toxicidad química.

Las lentejas de agua que crecen rápidamente en aguas ricas en nutrientes obviamente están tomando y asimilando los nutrientes. Además, estas plantas tienen una ventaja más debido a que crean un microecosistema en sus colonias, donde las bacterias desnitrificadoras se asocian a la rizosfera de la planta y ayudan a la eliminación de nutrientes en los ambientes acuáticos [7]. Además, la simbiosis con las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (*Plant Growth Promoting Bacteria* - PGPB) aumenta la adquisición de nutrientes y alivia a las plantas de estreses bióticos y abióticos. [19]

En los últimos años, la lenteja de agua ha sido reconocida como una materia prima ideal para la producción de biocombustibles, ya que su biomasa blanda y rica en almidón permite un mayor rendimiento de etanol combustible, butanol y biogás [19]. El cultivo de lenteja de agua en aguas residuales ricas en nutrientes ha ilustrado la diversidad de potencial de estos organismos para la remediación del agua [7] y para su uso en procesos energéticos.

La finalidad de este estudio es la de analizar la capacidad de asimilación por parte de las lentejas de agua de distintas concentraciones de nutrientes (nitratos y fosfatos) en niveles frecuentemente encontrados en las aguas residuales domésticas de nuestro entorno. Para alcanzar este fin, los objetivos secundarios de este trabajo de fin de grado son:

- Revisar bibliográficamente y recopilar información acerca del tema en cuestión.
- Evaluar la cantidad de biomasa, carbono orgánico y clorofila encontrada en las lentejas de agua.
- Estudiar los mecanismos de absorción de nutrientes por la lenteja de agua y el crecimiento de esta en un entorno de nutrientes limitados.
- Estudiar la importancia de la radiación para el crecimiento de la lenteja de agua y, a su vez, evaluar la pérdida que establece debido a la evaporación.
- Obtener las conclusiones del estudio.

Así pues, con estos objetivos, podríamos destacar si realmente las lentejas de agua son buenas plantas para el uso en plantas de estación depuradoras como acumuladoras de nutrientes.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo durante los meses de octubre a mayo (curso académico 2017-2018), incluyendo dos fases de trabajo:

- FASE I. Debido a que no teníamos experiencia previa en el cultivo de lenteja de agua, se realizó una primera fase (octubre – abril) de control y conocimiento de la lenteja de agua, así como de factores que influyen en su crecimiento (temperatura, evaporación, etc). De este modo se pudo determinar el mejor método para el cultivo de la planta con los recursos disponibles y poner a punto los métodos de análisis de las mismas:
- FASE II. En la segunda parte del trabajo (abril – mayo), se realizaron los experimentos que constituyen este trabajo. Se cultivaron las plantas y analizaron aguas y material vegetal, con la finalidad de estudiar el potencial de la lenteja de agua en la asimilación de nutrientes y los efectos que puede causar en ellas un déficit/exceso de nutrientes.

Las lentejas de agua fueron recogidas en la EDAR de Aspe, donde tenían un crecimiento excesivo. Los experimentos se llevaron a cabo en el invernadero de la Universidad Miguel Hernández (Campus de Elche), que, si bien no dispone de un sistema para el control de temperatura y humedad ambiental, evita la influencia del viento o adición de precipitaciones.

3.1. Aclimatación

Durante la Fase I de trabajo, las lentejas de aguas se cultivaron en dos peceras de 10 y 35 litros (Figura 4). El objetivo era conseguir su aclimatación y disponer de suficiente material vegetal para desarrollar el experimento.

Durante el proceso de aclimatación en las peceras, que al principio estaban llenas de agua de la EDAR, se llevó a cabo un control de parámetros como pH, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, temperatura, nitratos y fosfatos. Se pudo observar en este proceso de aclimatación cómo la lenteja de agua es capaz de absorber los nutrientes del medio en cuestión de días.



Figura 4. Fotografía de la pecera de 35L en el proceso de aclimatación de la lenteja de agua en el invernadero.

Pasadas las primeras semanas de aclimatación, las lentejas fueron transferidas a un agua sintética de composición química conocida, realizándose de este modo un control y reposición de nutrientes del medio de cultivo. Se utilizó un fertilizante específico para plantas verdes (1ml por cada 5 L de agua sintética), cuya composición química se incluye en la Tabla 1. La reposición de esta agua sintética fue quincenal, siendo necesaria tanto para aportar nutrientes como para reponer el agua que se perdía por evaporación.

Tabla 1. Características del fertilizante empleado en el cultivo. Fuente: Compo.

Características de la solución de abono	(%)	ppm (mg/L)
Nitrógeno (N) total	7	70000
Nitrógeno (N) nítrico	3.3	33000
Asimilable a nitratos	14.61	146143
Nitrógeno (N) amoniacal	3.7	37000
Pentóxido de fósforo (soluble en agua) (P₂O₅)	3	30000
Óxido de potasio (K₂O)	6	60000
Boro (B)	0.01	100
Cobre (Cu) quelado por EDTA	0.002	20
Hierro (Fe) quelado por EDTA	0.05	500
Manganeso (Mn) quelado por EDTA	0.02	200
Molibdeno (Mo)	0.001	10
Zinc (Zn) quelado por EDTA	0.002	20

3.2. Diseño experimental

Las lentejas de agua se obtuvieron gracias a la colaboración de la EDAR de la localidad de Aspe, donde tenían un abundante crecimiento de estas plantas. En la misma mañana que las plantas fueron recolectadas, se procedió a su puesta en cultivo de aclimatación y realización de los primeros análisis del material vegetal. Fue posible identificar tres especies de lenteja de agua, siendo estas *Lemna minor* L., *Lemna minuta* Kunth y *Lemna gibba* L.

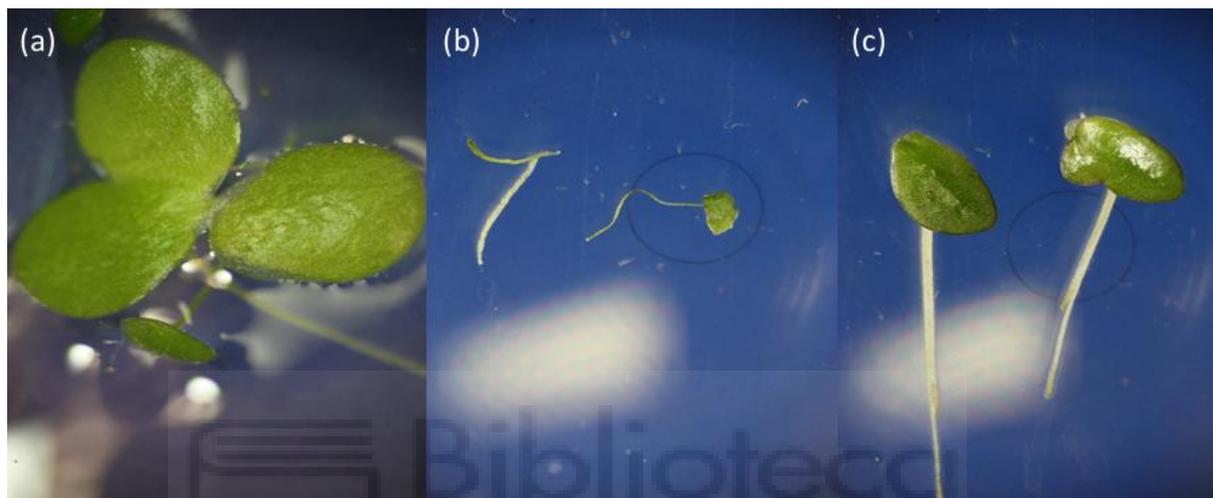


Figura 5. Fotografías tomadas con el binocular de (a) *Lemna minor*, (b) *Lemna minuta*, y (c) *Lemna gibba*. Fuente: elaboración propia.

La selección de las dosis experimentales de nutrientes estuvo relacionada con la problemática y concentración de nitratos y fosfatos disponible en la fase de tratamiento de la EDAR. Así pues, teniendo suficiente planta para poder hacer el experimento, se utilizaron bandejas de plástico (3,6 litros) para el cultivo, que fueron llenadas con 2 litros de agua con sus respectivas concentraciones de nutrientes (Tabla 2). En total se utilizaron 36 bandejas, con 3 réplicas para cada concentración de nitratos o fosfatos. Los reactivos empleados fueron nitrato potásico (KNO_3) y fosfato dipotásico (K_2HPO_4). La mitad de las bandejas fueron retiradas a los 5 días, con la finalidad de analizar las aguas y el material vegetal, mientras que la otra mitad fue retirada a los 10 días. Además, se incluyeron tres bandejas sin planta ni nutrientes, cuya finalidad era evaluar la evaporación del experimento. Las bandejas fueron distribuidas sobre la mesa del invernadero conforme a la distribución mostrada en la Tabla 3, con la finalidad obtener una distribución homogénea de las mismas.

Tabla 2. Números de identificación de las bandejas en el experimento. Se incluyen las respectivas concentraciones de nitratos o fosfatos, el día de muestreo y el número de réplica correspondiente.

	DÍA 10			DÍA 5				
	CONCENTRACIÓN (ppm)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	CONCENTRACIÓN (ppm)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
Nitratos	0	1	2	3	0	10	11	12
	50	4	5	6	50	13	14	15
	100	7	8	9	100	16	17	18
Fosfatos	0	19	20	21	0	28	29	30
	10	22	23	24	10	31	32	33
	20	25	26	27	20	34	35	36

Finalmente, se dejaron las plantas asimilar los nutrientes y, al cabo de 5 y 10 días se analizaron tanto el agua que queda en la bandeja como las lentejas de agua. De esta manera, se analizó el pH, nitratos y fosfatos que quedan en el agua después de dicho tiempo y, en cuanto a la planta, se analizó su biomasa, materia seca, clorofila y carbono orgánico presente en la planta.

Tabla 3. Esquema de distribución de las bandejas de cultivo. Se incluyen los números de identificación de cada bandeja.

	DÍA 10		DÍA 5		
1	4	7	28	32	34
5	8	21	31	35	12
9	20	24	36	11	15
19	23	27	10	13	16
22	26	3	14	17	30
25	2	6	18	29	33

A pesar de que la infraestructura no permite un control exhaustivo de las condiciones de cultivos, sí que procedimos a conocer las condiciones ambientales mediante la medición de temperatura y humedad ambiental, así como radiación incidente.

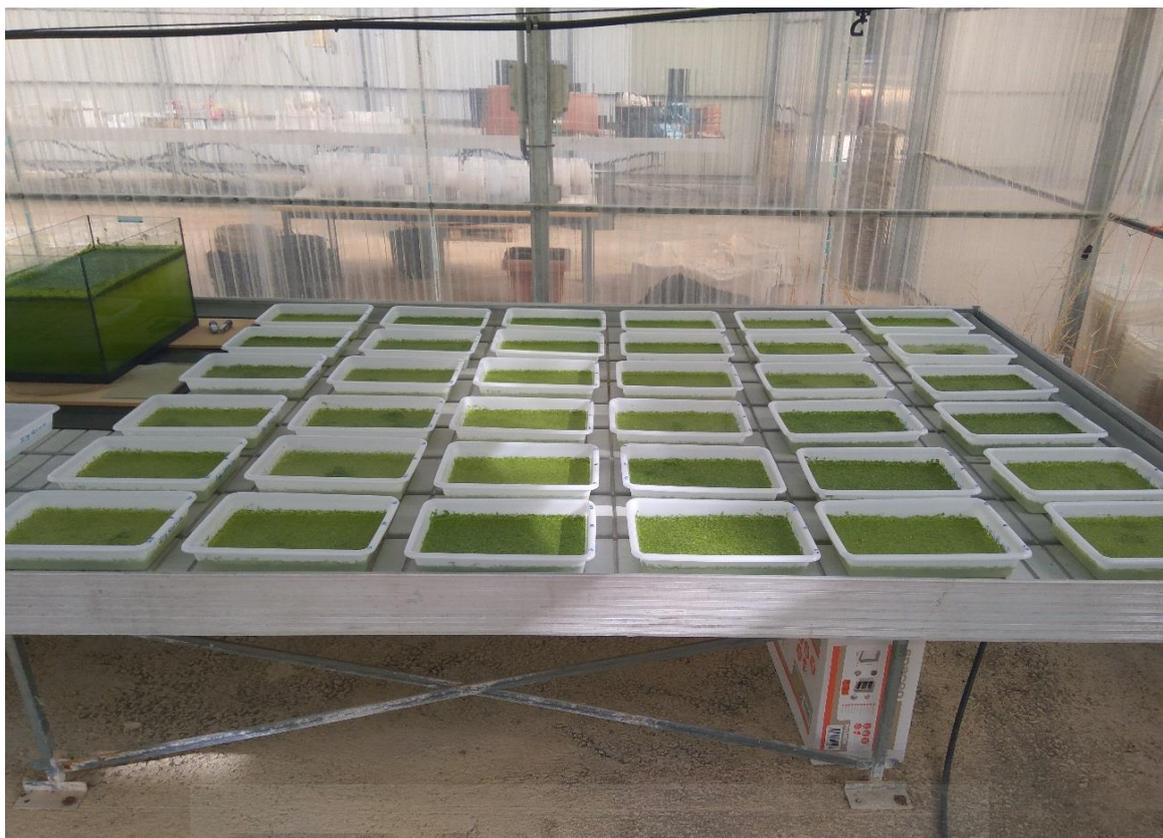


Figura 6. Fotografía de la distribución de las 36 bandejas en el invernadero.

La temperatura y humedad en el invernadero se registraron mediante un dispositivo DataLogger, con recogida de datos cada 30 minutos (Figura 7). Además, se realizaron mediciones frecuentes de radiación incidente, para evaluar la cantidad de radiación que llegaba a la mesa de cultivo, situada debajo de un parasol que atenuaba la radiación que incidía sobre las bandejas. Se tomaron medidas de la radiación con un radiómetro (Delta OHM), tanto fuera como dentro del invernadero y debajo del parasol a diferentes días y en distintas horas. La atenuación de fuera del invernadero a dentro (sin parasol) fue alrededor de un 73%, mientras que debajo del parasol, la atenuación alcanzaba valores de hasta el 88%. La presencia de parasol fue necesaria para reducir las pérdidas por evaporación a la hora de realizar el experimento ya que, de otro modo, la no existencia de un sistema de climatización promovería la evaporación de toda el agua de los experimentos en un periodo de tiempo muy corto.

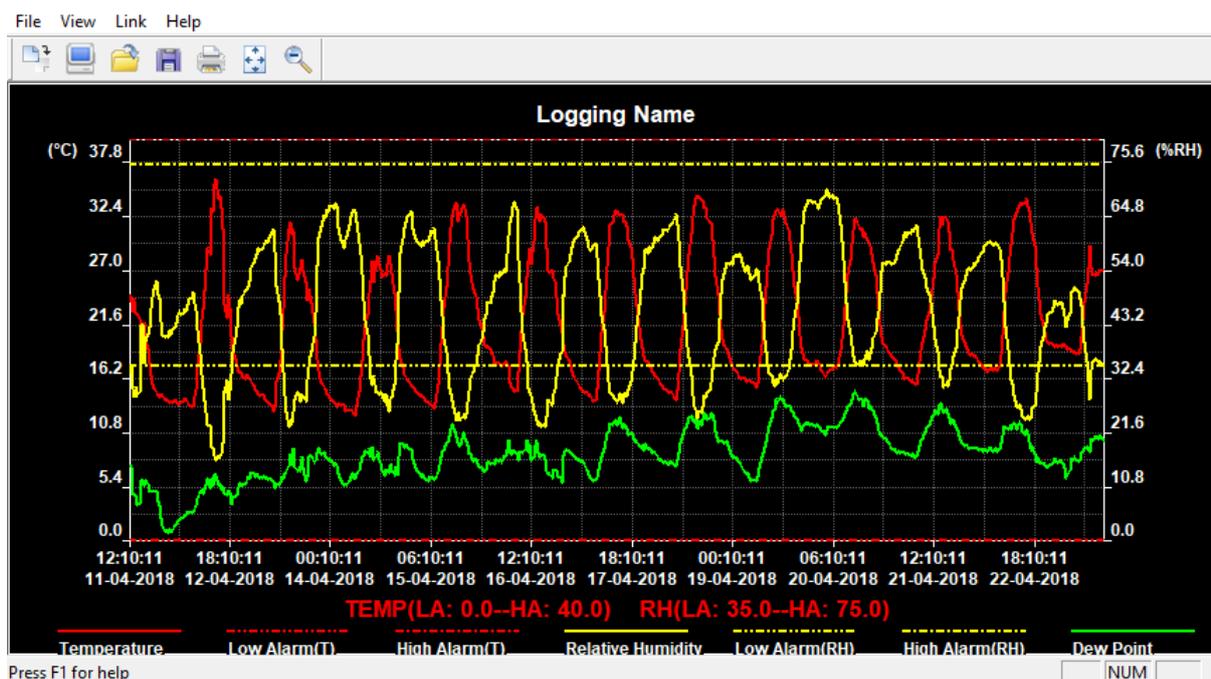


Figura 7. Resultados de temperatura y humedad desde el 11 de abril hasta el final del experimento (22 de abril. Fuente: elaboración propia.

3.3. Métodos de análisis de aguas

Evaporación

Se estimó cuál era la cantidad de agua evaporada durante el proceso de experimento para saber si con planta se evapora más o menos el agua de las bandejas. Para ello, antes de comenzar el experimento se pesaron todas las bandejas. Seguidamente, se volvieron a pesar una vez se les añadieron los dos litros de agua y una cantidad conocida de planta fresca. Finalmente, se pesaron a los 5 y 10 días del experimento para saber cuánto se ha evaporado, con sus respectivos pesos de escurrido, ya que la planta en esos días ha crecido y su masa es mayor.

Una vez tenemos todos los datos, se calcula el porcentaje del agua remanente utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Agua remanente (\%)} = \frac{\text{Peso agua día 5 ó 10}}{\text{Peso agua día 0}} * 100$$

Este dato nos indica el porcentaje de agua que nos queda en la bandeja pasados los 5 ó 10 días.

pH y Conductividad eléctrica

Para calcular los diferentes niveles de pH y conductividad eléctrica (CE), se tomaron 100 ml de agua de cada una de las bandejas. Para controlar el pH se utilizó una sonda Crison pH meter GLP 21 y para la conductividad eléctrica se utilizó una sonda Crison Conductimeter GLP 31. Se cogieron entre 3 y 5 medidas por muestra para calcular, más tarde, la media.

Nitratos

Aunque el nitrato absorbe fuertemente la luz ultravioleta, determinar el nitrato midiendo la absorbancia a una longitud de onda no es viable porque la materia orgánica natural y otros solutos pueden absorber luz ultravioleta. En el espectro del nitrato, la absorbancia incrementa rápidamente desde 230 a 210 nm, mientras que, en el espectro de la materia orgánica natural, la absorbancia en la misma longitud de onda incrementa gradualmente. Calculando la segunda derivada de una muestra, se elimina la contribución de la materia orgánica natural.

Para ello, se encontró la segunda derivada máxima en el rango 230 a 220 nm y, haciendo una regresión lineal utilizando las segundas derivadas de los espectros en blanco, utilizamos la siguiente expresión [20]:

$$C = \frac{S - Int}{Slp}$$

Donde:

C: Concentración de nitratos (mg/L en nuestro caso).

S: Máxima segunda derivada.

Int: Intersección de la línea de regresión.

Slp: Pendiente de la línea de regresión.

Fosfatos

Se determinó el fosfato mediante colorimetría. Para ello, en medio ácido y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo fosfomolibdico que es reducido por ácido ascórbico y desarrolla una coloración azul susceptible de una determinación colorimétrica. Así pues, se compara los resultados con patrones de fósforo como ion fosfato preparados en las mismas condiciones que las muestras.

3.4. Métodos de análisis de material vegetal

Biomasa fresca

La biomasa es una variable clave para establecer las tasas de consumo de nutrientes y el cálculo de los balances de masa de cualquier proceso biológico [21].

Para la determinación de la biomasa, se tuvo en cuenta los datos de los escurridos obtenidos mediante el experimento, tanto en los días 5 y 10, así como en el día 0. Así pues, con estos datos se pudo obtener tanto el incremento de biomasa fresca al cabo de estos días como la tasa de crecimiento relativo en gramos por día. Por lo tanto, con este resultado se pudieron obtener conclusiones acerca de cómo afecta la dosis al crecimiento de estas plantas.

Materia seca y humedad

Para realizar el análisis de materia seca se usó el método gravimétrico, por el que se pesaron en bandejas de papel una cantidad considerable de lenteja de agua fresca. De ahí, se pasaron a una estufa a 60°C y se dejaron secar hasta peso constante. A continuación, se volvieron a pesar y, mediante la resta del peso de muestra fresca menos el peso de la muestra seca, se obtuvo el peso seco de las lentejas de agua, utilizando la siguiente expresión:

$$Humedad (\%) = 100 - \left(\frac{Peso\ seco * 100}{Peso\ fresco} \right)$$

Carbono orgánico

Se ha estimado por diferentes autores que, en materia vegetal seca, la proporción de carbono está en torno al 45 y 50% [22]. Para realizar el análisis, se pesaron unos 0,5g de cada muestra de lenteja de agua en crisoles de peso conocido y se calcinaron en un horno mufla a 550°C durante 3 horas. Una vez enfriados en un desecador, se volvieron a pesar para cuantificar el peso de las cenizas. A partir de este peso podemos calcular el contenido en materia orgánica, utilizando un factor de conversión empírico de 0,475 [22]. Para calcular el contenido de carbono en cada muestra utilizamos la siguiente fórmula:

$$C_{org} = 0.475 * (Peso\ inicial - Peso\ cenizas) [g/kg\ m.s.]$$

Los valores obtenidos fueron relacionados con la cantidad de materia seca, expresándose los resultados en gramos de carbono orgánico por kilogramo de materia seca (m.s.).

Clorofilas totales

El objetivo de la medición de las clorofilas es conocer cómo el déficit o el superávit de nutrientes afecta a los pigmentos de cloroplastos de las lentejas de agua. Para determinar el contenido de clorofilas en estas plantas, utilizamos el método de extracción con acetona. Para ello, pesamos 0,5g de planta fresca y la extracción se realizó con 5 ml de acetona al 80% (20% agua destilada para evitar evaporación), Se dejaron las muestras 24 h en oscuridad para conseguir la correcta extracción de los pigmentos. Las clorofilas totales se cuantificaron mediante el empleo de un espectrómetro de doble haz de la marca PG Instruments T80 UV/VIS Spectrometer Se midió la absorbancia a longitudes de onda de 645 y 663 nm, utilizando cubetas de cuarzo tanto para el extracto de clorofilas como para el patrón de calibración (acetona al 80%). Para calcular las clorofilas totales se utilizó la siguiente expresión [23]:

$$\text{Clorofila total } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \text{ o } \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = (20,2 * DO645) + (8,02 * DO663)$$

3.4. Análisis estadísticos

Los datos experimentales fueron analizados estadísticamente. Se calcularon diversos estadísticos descriptivos (i.e., mínimo, máximo, media, desviación estándar,...), y se evaluó el tipo de distribución de los datos mediante test de Kolmogorov-Smirnov. Seguidamente se procedió a realizar comparaciones entre las medias y los subconjuntos homogéneos, para los distintos nutrientes y días del experimento. Se utilizó el test de Kruskal-Wallis, además del test de Dunn para calcular los subconjuntos ya que la pruebas nos daban una distribución no normal, por lo que se tuvo que utilizar estas pruebas no paramétricas. Estos análisis fueron realizados con el programa R (<https://www.r-project.org/>). Se trata de lenguaje de programación y entorno de software libre para análisis estadísticos y creación de gráficos.

Finalmente, se realizó un análisis de correlaciones bivariadas entre las variables experimentales. Se empleó el método no paramétrico de correlación por rangos de Spearman, para evaluar la relación entre variables. Este coeficiente es una medida de asociación lineal que utiliza los rangos (números en orden) de cada grupo de sujetos y compara dichos rangos [24]. Este último análisis estadístico se ha desarrollado con el programa IBM SPSS Statistics 24 (IBM Corporation, Armonk (NY), EEUU).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en los experimentos de evaluación de crecimiento de las lentejas de agua durante todos los procesos de cultivo (octubre a mayo del curso académico 2017-18), tanto en la primera fase de cultivo de aclimatación, como en la segunda fase del trabajo, realizada conforme al diseño experimental anteriormente expuesto.

4.1. Fase I. Caracterización general del material vegetal procedente de la EDAR

Una vez traídas las muestras de la depuradora de Aspe y su posterior aclimatación, se procedió a realizar unos análisis para caracterizar generalmente la planta, es decir, conocer cuáles son sus características en cuanto a su biomasa, carbono orgánico y clorofilas totales. Además, estos análisis ayudaron a mejorar las técnicas de laboratorio para los posteriores análisis del experimento, siendo estos más exhaustivos, así como de adquirir experiencia y fomentar la destreza en el trabajo en laboratorio.

Primero, se pusieron en bandejas de papel una cierta cantidad de lentejas de agua (aproximadamente 50-60 g) que fueron convenientemente pesadas para obtener su peso exacto de biomasa fresca. Las bandejas con las plantas fueron introducidas en una estufa a 60°C para proceder al secado del material vegetal. Una vez que se obtuvo un peso constante, se registró el peso de materia seca. Haciendo esto, se determinó cuántos gramos de materia seca se obtenían por cada 100 gramos de materia fresca, siendo aproximadamente 4,23 gramos por cada 100 gramos de biomasa fresca. De este modo se obtiene que el contenido de humedad promedio de las lentejas de agua utilizadas en los experimentos fue de 95,8 % (0,3 % de desviación estándar).

A partir del material vegetal seco obtenidas en el paso anterior, se determinó carbono orgánico de las mismas por el método de la calcinación. Se obtuvo un valor promedio de 0,40 gramos por kilogramo de materia seca.

Finalmente se realizó una cuantificación de las clorofilas totales para disponer de una referencia de contenido de tales pigmentos fotosintéticos en las muestra de lentejas de agua recién recolectadas. Se obtuvo un valor promedio clorofilas totales de 14,6 miligramos por litro de extracto (1,7 mg/L de desviación estándar).

4.2. Fase II. Desarrollo experimental

En la segunda parte del trabajo (abril – mayo), se realizaron los experimentos encaminados a estudiar el potencial de la lenteja de agua en la asimilación de nutrientes y los efectos que puede causar en ellas un déficit/exceso de nutrientes. El experimento principal fue desarrollado mediante un cultivo sin reposición de agua. Por este motivo, un factor muy importante que teníamos que tener en cuenta era la evaporación del agua y la transpiración debida a las plantas, ya que estas debían hasta un máximo de 10 días, que era la duración máxima del experimento. A los días 0, 5 y 10 se pesaron las bandejas (todas las disponibles) para calcular las variaciones de masa y estimar la magnitud de las pérdidas por evaporación. En el momento de la recolección (5 o 10 días) se recolectaron las lentejas de agua mediante un filtro y se dejaron escurrir para, inmediatamente, pesarlas para obtener el valor de biomasa fresca en el momento de la recolección (hay que recordar que se había registrado el peso de lentejas que se incorporó a cada bandeja). Además, se tomaron muestras de agua para realizar análisis químicos del agua en el laboratorio del edificio Alcudia.

Respecto a la evaporación, ninguna bandeja se quedó sin agua durante el tiempo experimental correspondiente a cada una de ellas. Se pudo calcular el agua remanente a los cinco días, para estimar la cantidad de agua que se había evaporado en las bandejas agua. Trabajando con este valor, se realizó primeramente un análisis descriptivo con su test de Kruskal-Wallis (Tabla 4) entre los distintos tipos de experimento (control, nitratos y fosfatos), teniendo todos planta excepto el control.

Tabla 4. Análisis exploratorio del agua remanente según los distintos experimentos realizados (%). Se incluye test de Kruskal-Wallis con sus respectivos subconjuntos (Dunn)

Variable	Control	Fosfatos	Nitratos	p-valor
Agua remanente (%)	69,11 ± 3,12 a	61,99 ± 2,55 b	61,79 ± 2,20 b	0,039*

Niveles de significatividad: [*] p -valor $\leq 0,05$

Se puede apreciar que hay diferencias significativas (p -valor $\leq 0,05$) entre los tres tipos de bandejas, permitiéndonos el test de Dunn identificar un comportamiento análogo entre las bandejas con lentejas de agua (aquellas con dosis experimentales de nitratos o fosfatos). Por lo tanto, se concluye que las bandejas que contenían planta tenían menos agua (aproximadamente un 62% del agua inicial) que las que no tenían planta (69%). Se concluye que la transpiración lentejas de agua contribuyeron a eliminar un 7-8% de la cantidad de agua inicialmente disponible.

4.3. Fase II. Eliminación de nutrientes del agua

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el laboratorio, respecto a la concentración de nutrientes, nutrientes eliminados, además de pH y conductividad eléctrica.

➤ Nitratos

En la tabla 5 se muestran los estadísticos descriptivos de media y desviación estándar, además de los resultados del test de Kruskal-Wallis, para la concentración de nitratos, de cantidad de nitratos eliminados, pH y conductividad eléctrica.

Tabla 5. Análisis exploratorio de las características del agua en los experimentos con nitratos y test Kruskal-Wallis con sus respectivos subconjuntos (Dunn).

Días	Dosis (mg/L)	Nitratos (mg/L)	Nitratos eliminados (mg/L)	pH	CE (μ S/cm)
5	0	0,109 \pm 0,054 a	1,193 \pm 0,054 a	8,81 \pm 0,16 a	1087,33 \pm 20,50
	50	6,236 \pm 1,780 ab	45,066 \pm 1,780 b	9,67 \pm 0,05 ab	1108,33 \pm 7,10
	100	64,695 \pm 6,481 b	36,607 \pm 6,481 ab	9,81 \pm 0,09 b	1238,67 \pm 19,09
	p-valor	0,027*	0,027*	0,027*	0,051
10	0	0,551 \pm 0,075	0,752 \pm 0,075 a	8,60 \pm 0,12	1775,00 \pm 106,66
	50	0,991 \pm 0,083	50,312 \pm 0,083 ab	8,66 \pm 0,23	1749,67 \pm 114,03
	100	2,346 \pm 2,254	98,957 \pm 2,254 b	9,18 \pm 0,54	1799,67 \pm 46,23
	p-valor	0,051	0,003**	0,113	0,670

Niveles de significatividad: [*] p -valor \leq 0,05 ; [**] p -valor \leq 0,01

Se observa que eliminación de los nitratos por parte de la planta es extraordinaria, ya que a los 5 días se observa que se han eliminado casi la mitad (45,066 mg/L en la dosis de 50 ppm), mientras que a los 10 días prácticamente ha eliminado del medio acuático todo el nitrógeno en forma nitratos (98,957 mg/L en la dosis de 100 ppm). Asimismo, en cuanto al pH se observa un aumento cuando se le adiciona nitratos, pasando de un pH de 8,81 a 9,81 cuando se le añade una dosis de 100 ppm.

Seguidamente se realizó un test de Kruskal-Wallis para comparar los valores medios de las variables experimentales en función de la dosis experimental, tanto para los 5 días como al final del experimento. Se observó que todas, a excepción de la conductividad eléctrica, tienen diferencias significativas al día 5, mientras que el día 10 sólo se encontraron diferencias significativas para los nitratos eliminados (p -valor \leq 0,01). Seguidamente, se realizó el análisis de los subconjuntos mediante el test de Dunn, observándose que en el día 5 la dosis baja y alta de nitratos pertenecen a subconjuntos distintos, mientras que la dosis media está integrada en ambas. Con el pH ocurre lo mismo que el caso anterior, sin embargo, los nitratos eliminados presentan que la dosis baja y media son subconjuntos

distintos mientras que la dosis alta está integrada en ambas. En el día 10, las dosis baja y alta para nitratos eliminados pertenecían a subconjuntos distintos ya que el factor del tiempo hace que la dosis alta pueda eliminar más nitratos durante más días.

Para comprobar si hay relación entre estas variables, se realizó un test de correlación bivariada de Spearman. (Tabla 6). Mediante este test obtener información de las relaciones entre las variables medidas en el laboratorio. Se obtuvieron correlaciones significativas entre nitratos y pH ($p \leq 0.01$). Por el contrario, tanto la relación entre nitratos y conductividad eléctrica como la relación entre conductividad eléctrica y pH, no fueron significativas. Estudios previos realizados en el Área de Ingeniería Química en cursos fluviales cercanos [25] también observaron que el desarrollo de la vegetación acuática provoca un aumento de pH en las aguas, ya que las especies carbonatadas se eliminan del agua en el proceso fotosintético [26]. Por otra parte, la conductividad eléctrica manifiesta un ligero aumento cuando se le añaden nitratos, esto puede ser debido a que, al utilizar nitrato potásico (KNO_3), que es una sal, esta se disocia completamente haciendo que haya más sales en el medio, por lo que la conductividad eléctrica se ve afectada.

Tabla 6. Test de correlación de Spearman para nitratos, nitratos eliminados, pH y conductividad eléctrica.

	Nitratos (mg/L)	Nitratos eliminados (mg/L)	pH	CE ($\mu S/cm$)
Nitratos (mg/L)	1	0,383	0,668**	0,049
Nitratos eliminados (mg/L)	0,383	1	0,264	0,276
pH	0,668**	0,264	1	-0,331
CE ($\mu S/cm$)	0,049	0,276	-0,331	1

Niveles de significatividad: [**] p -valor $\leq 0,01$

➤ Fosfatos

En la tabla 7 se muestran los estadísticos descriptivos de media y desviación estándar, además de los resultados del test de Kruskal-Wallis, para la concentración de fosfatos, su tasa de eliminación, pH y conductividad eléctrica.

Se observa que la eliminación de los fosfatos por parte de la planta es bastante alta aun siendo la dosis suministrada un tanto baja, tanto en el día 5 como en el día 10, los fosfatos eliminados fueron muy parecidos para las mismas concentraciones. Respecto al pH, en el día 5 se observó un ligero

aumento (de 8,94 en la dosis control a 9,23 en la dosis de 10 ppm) mientras que a los 10 días disminuyó considerablemente (8,67 para la dosis de 10 ppm). Por el contrario, la conductividad eléctrica manifestó un aumento muy considerable por la misma razón que la de los nitratos, es decir, al añadir una sal (en este caso fosfato dipotásico, K_2HPO_4), se disoció completamente en el agua y esto provoca el aumento de la conductividad eléctrica.

Tabla 7. Análisis exploratorio de las características del agua experimentos con fosfatos y test de Kruskal-Wallis con sus respectivos subconjuntos (Dunn).

Días	Dosis (mg/L)	Fosfatos (mg/L)	Fosfatos eliminados (mg/L)	pH	CE ($\mu S/cm$)
5	0	0,071±0,007	-0,071±0,007 a	8,94±0,09	1077,00±24,02
	10	0,062±0,007	9,938±0,007 ab	9,23±0,37	1080,67±28,02
	20	0,065±0,008	19,934±0,008 b	9,05±0,05	1072,67±13,65
	p-valor	0,329	0,027*	0,288	0,955
10	0	0,076±0,009	0,011±0,039 a	8,84±0,24	1670,00±89,45
	10	0,083±0,008	10,026±0,024 ab	8,67±0,06	1700,33±109,23
	20	0,079±0,014	19,970±0,078 b	8,81±0,17	1792,00±135,57
	p-valor	0,733	0,027*	0,430	0,329

Niveles de significatividad: [*] p -valor $\leq 0,05$

Los resultados del test de Kruskal-Wallis mostraron que había diferencias significativas en los fosfatos eliminados. El test de Dunn permitió determinar subconjuntos diferentes, observándose que la dosis baja y alta de nitratos pertenecen a subconjuntos distintos, mientras que la dosis media está integrada en ambas. Este es debido a que cuando la dosis de fosfatos es alta, la lenteja de agua tiende a capturar más nutrientes y son capaces de retenerlo en su biomasa [17].

Para comprobar si hay relación entre estas variables, se realizó un test de correlación bivariada por el método de Spearman (Tabla 8). Mediante este test de correlación, se obtuvieron correlaciones significativas entre los fosfatos y la conductividad eléctrica ($p \leq 0.01$). Esto es debido a que la adición de sales al medio (K_2HPO_4), hace que aumente la conductividad eléctrica ya que la sal se disocia totalmente en el medio acuoso. Además, se muestran correlaciones significativas inversas (signo negativo) entre conductividad eléctrica y pH.

Tabla 8. Test de correlación de Spearman para fosfatos, fosfatos eliminados, pH y conductividad eléctrica.

	Fosfatos (mg/L)	Fosfatos eliminados (mg/L)	pH	CE ($\mu\text{S/cm}$)
Fosfatos (mg/L)	1	-0,003	-0,387	0,723**
Fosfatos eliminados (mg/L)	-0,003	1	-0,057	0,272
pH	-0,387	-0,057	1	-0,593**
CE ($\mu\text{S/cm}$)	0,723**	0,272	-0,593**	1

Niveles de significatividad: [**] p -valor $\leq 0,01$

4.4. Fase II. Desarrollo vegetal y eliminación de nutrientes del agua

Para calcular el efecto de los nutrientes en la lenteja de agua, se optó por analizar las clorofilas de la planta, calcular la tasa de crecimiento tanto en materia seca como fresca y el carbono orgánico. Además, se calculó la tasa de asimilación de nutrientes. A continuación, se explicará el efecto de los nitratos y los fosfatos.

➤ Nitratos

En la tabla 9 se muestran los estadísticos descriptivos de media y desviación estándar de los análisis y cálculos tomados en el laboratorio, además de los resultados del test de Kruskal–Wallis para las distintas variables analizadas.

Se observa que el carbono orgánico no presenta ninguna diferencia significativa para las distintas dosis ensayadas. Es aproximadamente siempre es el mismo valor (0,2 gramos de carbono por kilogramo de materia seca). Sin embargo, la biomasa sí que muestra diferencias entre las dosis. Mientras que a los 5 días la lenteja de agua tiene un aumento al alza en biomasa tanto en la dosis media como en la dosis alta (4,6 y 5,5 gramos al día, respectivamente), a los 10 días el crecimiento disminuye considerablemente (3,7 y 3,8 gramos al día, respectivamente), lo cual puede ser debido al que el nutriente ya no abunda y existe una competitividad por él, lo cual hace que las tasas de biomasa se reduzcan. Por otro lado, las clorofilas se muestran muy altas en los 5 primeros días (32,59 para la dosis media y 31,12 para la dosis alta). Sin embargo, pasados 10 días, se observa que las clorofilas se reducen (18,68 para la dosis media y 20,13 para la dosis alta) debido a que el aumento de la población

de lentejas en las bandejas es menor conforme va pasando el tiempo. Además, podemos observar ese aumento de las clorofilas en el ciclo del nitrógeno (Figura 2), donde un aumento de la concentración de nitratos conlleva a que la planta produzca más procesos de fotosíntesis, es decir, más clorofila.

Tabla 9. Análisis exploratorio de los distintos parámetros calculados en los experimentos con nitratos. Se incluye test de Kruskal-Wallis con sus respectivos subconjuntos (Dunn)

Días	Dosis (mg/L)	Nitratos (mg/L)	Nitratos eliminados (mg/L)	Carbono orgánico (g/kg m.s.)	Incremento biomasa fresca (g/d)	Incremento materia seca (g/d)	Clorofilas totales (mg/L)
5	0	0,109±0,054 a	1,193±0,054 a	0,210±0,003	3,553±0,982	0,200±0,034	19,38±1,22
	50	6,236±1,780 ab	45,066±1,780 b	0,198±0,008	4,667±0,897	0,236±0,027	32,59±2,27
	100	64,695±6,481 b	36,607±6,481 ab	0,221±0,016	5,500±0,517	0,249±0,042	31,12±5,81
	p-valor	0,027*	0,027*	0,061	0,079	0,288	0,066
10	0	0,551±0,075	0,752±0,075 a	0,215±0,016	3,170±0,361	0,174±0,017	12,42±1,82
	50	0,991±0,083	50,312±0,083 ab	0,206±0,010	3,743±0,231	0,194±0,002	18,68±1,43
	100	2,346±2,254	98,957±2,254 b	0,201±0,005	3,813±0,304	0,174±0,016	20,13±4,27
	p-valor	0,051	0,003**	0,329	0,116	0,113	0,066

Niveles de significatividad: [*] p -valor $\leq 0,05$ [**] p -valor $\leq 0,01$

El test de Kruskal-Wallis dio como resultado que al día 5, los nitratos presentaban diferencias significativas entre las dosis, diferenciándose subconjuntos entre ellas: un primero para la dosis baja, un segundo subconjunto para la dosis alta y otro subconjunto que está a mitad de ambas dosis que es la media. Además, los nitratos eliminados en el día 5 se dividen en dos subconjuntos (dosis baja frente a la dosis media) siendo la dosis alta una integración en las anteriores, mientras que el día 10 es la dosis media la que está integrada entre la dosis baja y la dosis alta. Esto nos hace pensar que, al tener más concentración de nutriente, a los 10 días la lenteja de agua puede seguir captando de la dosis más alta. Sin embargo, a los 5 días todavía sigue habiendo exceso de nutrientes en el medio, por lo que se elimina la misma concentración de nitratos. En cuanto a las clorofilas, se observa que a los 5 días el aumento de estas es muy considerable, pero conforme pasa el tiempo, su concentración disminuye conforme la dosis de nitratos que se le suministre. Así pues, de acuerdo con [27], estas plantas se pueden usar de manera efectiva para reducir los niveles de nitrógeno en las aguas enriquecidas con nutrientes.

Para comprobar si hay relación entre estas variables, se realizó un test de correlación bivariada por el método de Spearman (Tabla 10).

Tabla 10. Test de correlación de Spearman de nitratos, nitratos eliminados, clorofilas totales, carbono orgánico, tasa de crecimiento de materia seca y tasa de crecimiento de materia fresca

	Nitratos (mg/L)	Incremento materia fresca (g/d)	Clorofilas totales (mg/L)	Carbono orgánico (g/kg m.s.)	Nitratos eliminados (mg/L)	Incremento materia seca (g/d)
Nitratos (mg/L)	1	0,682**	0,684**	-0,123	0,631**	0,540*
Incremento materia fresca (g/d)	0,682**	1	0,719**	0,090	0,455	0,577*
Clorofilas totales (mg/L)	0,684**	0,719*	1	-0,185	0,579*	0,682**
Carbono orgánico (g/kg m.s.)	-0,123	0,090	-0,185	1	-0,511*	-0,049
Nitratos eliminados (mg/L)	0,631**	0,455	0,579*	-0,511*	1	0,249
Incremento materia seca (g/d)	0,540*	0,577*	0,682**	-0,049	0,249	1

Niveles de significatividad: [*] p -valor $\leq 0,05$; [**] p -valor $\leq 0,01$

Lo primero que llama la atención de la tabla anterior es que la adición de nitratos al medio afecta significativamente tanto a la materia seca ($p \leq 0,05$) como a la materia fresca ($p \leq 0,01$). Debido a que el medio tenía un exceso de nutrientes (nitratos), la lenteja de agua fue capaz de asimilar este exceso y aumentar su tasa de crecimiento (Figura 8). Según Boyd [17], el crecimiento de las plantas a menudo aumenta en respuesta al aumento de las concentraciones de nitrógeno, porque la escasez de nitrógeno disponible es un factor limitante en muchos ecosistemas acuáticos.

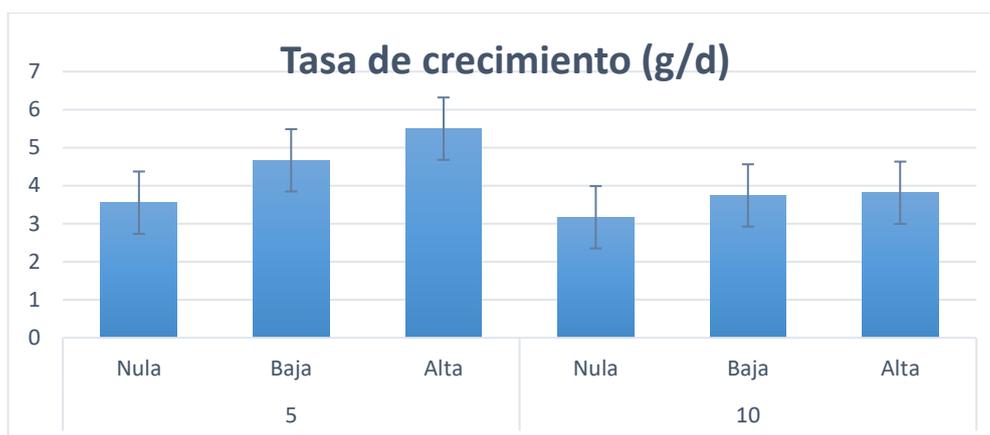


Figura 8. Variación de la tasa de crecimiento de las lentejas de agua respecto a la dosis suministrada de nitratos.

Por otra parte, también existen diferencias significativas entre las clorofilas y las tasas de crecimiento ($p \leq 0.01$). Se concluye que esta correlación es debida a que el aumento de la población de lentejas, conlleva a su vez a un aumento de las clorofilas. En la Figura 9 podemos observar el aumento de las clorofilas (A, B y totales), según la dosis de nitratos y los días de muestreo.

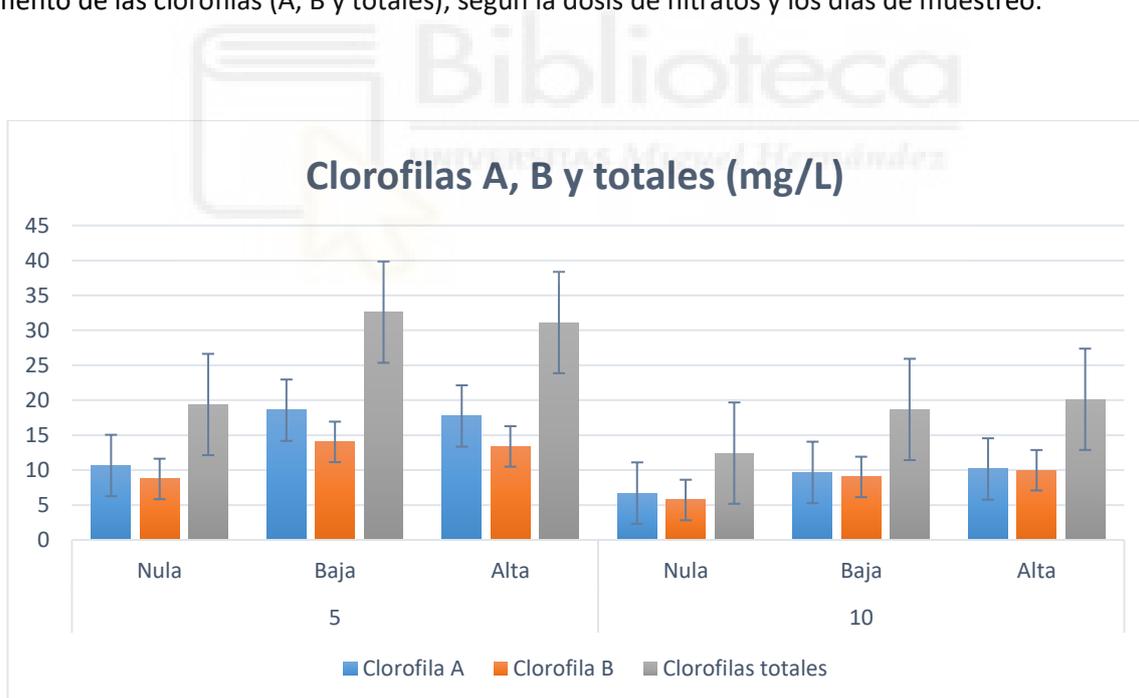


Figura 9. Variación de las clorofilas A, B y totales respecto al tiempo y la dosis suministrada de nitratos.

Se observa en la figura anterior que, a los 5 días de suministrar nitratos, las clorofilas aumentan considerablemente debido a una rápida reacción de la lenteja de agua por absorber los nitratos. Sin embargo, a los 10 días se puede observar una disminución en cuanto al nivel de clorofila. Pasados

tantos días, los nutrientes ya se han consumido y no queda tampoco tanta agua para soportar un mayor crecimiento de las plantas, por lo que muchas no se reproducen o acaban muriendo. Esto se aprecia en la segunda parte de la tabla donde, en el día 10, la concentración de clorofilas en las plantas ha disminuido.

➤ **Fosfatos**

En la tabla 11 se muestran los estadísticos descriptivos de media y desviación estándar de los análisis y cálculos tomados en el laboratorio, además de los resultados del test de Kruskal-Wallis para las distintas variables analizadas.

Tabla 11. Análisis exploratorio de los distintos parámetros calculados en los experimentos con fosfatos. Se incluye test de Kruskal-Wallis con sus respectivos subconjuntos (Dunn)

Días	Dosis (mg/L)	Fosfatos (mg/L)	Fosfatos eliminados (mg/L)	Carbono orgánico (g/kg m.s.)	Incremento Biomasa fresca (g/d)	Incremento materia seca (g/d)	Clorofilas totales (mg/L)
5	0	0,071±0,007	-0,071±0,007 a	0,207±0,007	3,793±0,145	0,231±0,019	22,04±2,03
	10	0,062±0,007	9,938±0,007 ab	0,209±0,008	3,860±0,703	0,209±0,049	19,84±1,70
	20	0,066±0,008	19,934±0,008 b	0,211±0,008	3,671±0,215	0,206±0,012	18,73±0,87
	p-valor	0,329	0,027*	0,733	0,561	0,288	0,113
10	0	0,076±0,009	0,011±0,039 a	0,212±0,003	3,053±0,312	0,170±0,010	13,84±6,17
	10	0,083±0,008	10,026±0,024 ab	0,211±0,004	3,353±0,067	0,171±0,014	11,67±1,16
	20	0,080±0,014	19,970±0,078 b	0,218±0,005	2,813±0,215	0,147±0,004	10,89±3,25
	p-valor	0,733	0,027*	0,301	0,127	0,066	0,837

Niveles de significatividad: [*] p-valor ≤ 0,05

Observando la tabla anterior se concluye que el carbono orgánico no presenta diferencias significativas según la dosis suministrada de fosfatos ni los días de muestreo (0,2 gramos de carbono por kilogramo de materia seca). Asimismo, la biomasa (incremento de biomasa fresca e incremento de materia seca) tampoco se ve afectada según la dosis, pero sí en los días, teniendo un aumento de la biomasa fresca de alrededor de 3,7 gramos por día y 0,21 gramos al día de materia seca al día 5 y menguando a los 10 días a 3 gramos por día en biomasa fresca y 0,15 gramos por día en materia seca. En cuanto a las clorofilas, se observó que mayor dosis de fosfatos, las concentraciones de clorofilas

eran menores, obteniéndose los mayores valores para la dosis cero de fosfatos (22,04 mg/L) y los menores para la dosis más alta de fosfatos (18.73 mg/L). Además, respecto de los días también disminuyó considerablemente llegando a valores de 10 mg/L aproximadamente.

Los resultados del test de Kruskal-Wallis demostraron que los fosfatos eliminados presentaban diferencias significativas, debido a que se establecían diferencias entre las dosis, dividiéndose entre distintos subconjuntos las dosis tanto al día 5 como al día 10. Es decir, dependiendo de la dosis que haya en el medio, la lenteja de agua es capaz de capturar más cuanto más fosfato hay. De acuerdo con Boyd [17], las plantas macrófitas pueden eliminar el fósforo del agua muy rápidamente y almacenar grandes cantidades de fósforo en su biomasa. Así pues, como comenta Reddy y De Busk [27], las lentejas de agua se pueden usar de manera efectiva para reducir los niveles de fósforo en las aguas enriquecidas con nutrientes.

Para comprobar si hay relación entre estas variables, se realizó un test de correlación bivariada por el método de Spearman (Tabla 12).

Tabla 12. Test de correlación de Spearman de fosfatos, fosfatos eliminados, clorofilas totales, carbono orgánico, tasa de crecimiento de materia seca y tasa de crecimiento de materia fresca.

	Fosfatos (mg/L)	Incremento Materia fresca (g/d)	Clorofilas totales (mg/L)	Carbono orgánico (g/kg m.s.)	Fosfatos eliminados (mg/L)	Incremento Materia seca (g/d)
Fosfatos (mg/L)	1	-0,350	-0,534*	0,015	-0,236	-0,247
Incremento Materia fresca (g/d)	-0,350	1	0,605*	-0,268	-0,137	0,871**
Clorofilas totales (mg/L)	-0,534*	0,605**	1	-0,102	-0,253	0,651**
Carbono orgánico (g/kg m.s.)	0,015	-0,268	-0,102	1	0,296	-0,234
Fosfatos eliminados (mg/L)	-0,236	-0,137	-0,253	0,296	1	-0,286
Incremento Materia seca (g/d)	-0,247	0,871**	0,651**	-0,234	-0,286	1

Niveles de significatividad: [*] p -valor $\leq 0,05$; [**] p -valor $\leq 0,01$

Lo primero que llama la atención de la tabla anterior es que las clorofilas totales con los fosfatos representan una correlación significativa inversa, lo que indica que probablemente los fosfatos actúen de una manera en la planta en la que las concentraciones de clorofila disminuyen ($p \leq 0,05$). En la figura

10 podemos observar la disminución de las clorofilas A, B y totales con la adición de los fosfatos, ya que las bandejas control presentaban más concentración de clorofila.

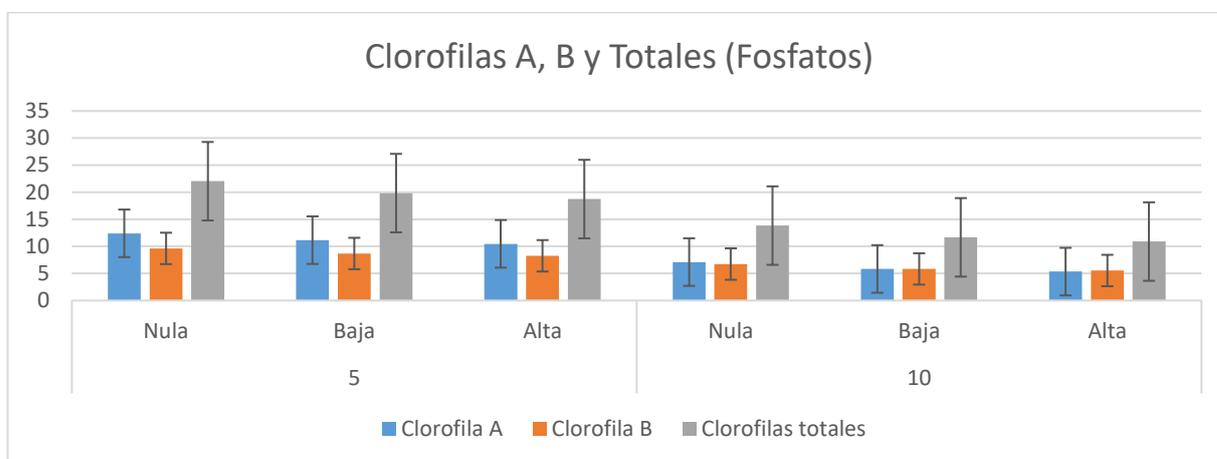


Figura 10. Variación de las clorofilas A, B y totales respecto al tiempo y la dosis suministrada de fosfatos.

Además, también se aprecia relación tanto entre las clorofilas totales y la materia fresca ($p \leq 0,01$), como entre las clorofilas totales y la materia seca ($p \leq 0,01$). Esto nos indica que las lentejas de agua en un medio en el que predominan los fosfatos, pueden presentar clorosis ya que, aunque aumente la población de planta, las clorofilas disminuyen conforme más concentración de fosfatos tenga el medio.

Por otro lado, existe relación entre la materia seca y la materia fresca ($p \leq 0,01$), ya que, si la planta crece y se reproduce, tiene que haber un aumento de su biomasa. De acuerdo con Boyd [17], en la mayoría de los ecosistemas, un aumento de la concentración de fósforo causará una mayor respuesta en el crecimiento de la planta que un aumento en la concentración de nitrógeno.

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Este Trabajo Fin de Grado en Ciencias Ambientales nos ha permitido analizar las cómo responden las lentejas de agua a diferentes concentraciones de nutrientes, particularmente nitratos y fosfatos. Las concentraciones experimentales han sido en consonancia con las que se encuentran en las últimas fases de tratamiento de aguas residuales en EDAR de nuestro entorno, pero que en caso de verterse al medio, generarían graves problemas de eutrofización. En este sentido, se ha demostrado el gran potencial de las lentejas de agua para la eliminación de nutrientes. Tanto si el nutriente experimental es nitrato o fosfato, las lentejas de agua son capaces de asimilarlo con una gran eficiencia, produciendo a su vez un gran incremento de biomasa vegetal que podría tener usos adicionales.

Además de esta conclusión general, se ha obtenido un valioso conjunto de conocimientos relativos al comportamiento específico de las lentejas de agua para diferentes concentraciones de nitratos o fosfatos. Lecciones tales como que las variaciones en las concentraciones de clorofilas son más sensibles a los cambios de concentración de nitratos que de fosfatos, o que la concentración de carbono orgánico de materia seca no exhibe diferencias significativas para las diferentes concentraciones de nutrientes experimentadas, contribuyen a comprender mejor el funcionamiento de estos interesantes organismos.

Por lo tanto, el uso de las lentejas de agua en las estaciones depuradoras de aguas residuales, puede ser una solución sostenible para poder eliminar el exceso de nutrientes sin recurrir a costosos procesos físico-químicos, pudiendo además generarse una biomasa de alta calidad y potencial utilidad adicional. Además, la lenteja de agua puede tener uso en los sistemas naturales, como estanques o lagos que presenten un exceso de nutrientes, ya que podría ayudar a mejorar la calidad de las aguas.

Así pues, la lenteja de agua es una planta que tiene un alto potencial de estudio para futuras investigaciones en las que se pueda implementar a las EDAR y sistemas naturales, ya que pueden mejorar la calidad del agua, eliminando o facilitando la eliminación de excesos de nutrientes, metales pesados y microcontaminantes orgánicos.

6. REFERENCIAS

6.1. Referencias bibliográficas

- [1] J. J. Cheng and A. M. Stomp, "Growing Duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed," *Clean - Soil, Air, Water*, vol. 37, no. 1, pp. 17–26, 2009.
- [2] A. Sims, S. Gajaraj, and Z. Hu, "Nutrient removal and greenhouse gas emissions in duckweed treatment ponds," *Water Res.*, vol. 47, no. 3, pp. 1390–1398, 2013.
- [3] M. D. C. Jaramillo Jumbo, E. D. Flores Campoverde, and J. Ulloa, "Fitorremediación mediante el uso de dos especies vegetales Lemna minor (Lenteja de agua), y Eichornia crassipes (Jacinto de agua) en aguas residuales producto de la actividad minera.," 2012.
- [4] Y. Zhao *et al.*, "Potential of duckweed in the conversion of wastewater nutrients to valuable biomass: A pilot-scale comparison with water hyacinth," *Bioresour. Technol.*, vol. 163, pp. 82–91, 2014.
- [5] M. del P. (Escuela de I. de A. M.-C. Arroyave, "LA LENTEJA DE AGUA (Lemna minor L.): UNA PLANTA ACUÁTICA PROMISORIA," *Rev. EIA. ISSN 1794-1237*, vol. I, pp. 33–38, 2004.
- [6] W. Cui and J. J. Cheng, "Growing duckweed for biofuel production: A review," *Plant Biol.*, vol. 17, no. s1, pp. 16–23, 2015.
- [7] P. Ziegler, K. S. Sree, and K. J. Appenroth, "Duckweeds for water remediation and toxicity testing," *Toxicol. Environ. Chem.*, vol. 98, no. 10, pp. 1127–1154, 2016.
- [8] R. A. Leng, "Duckweed: A tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment," *FAO*, 1999. [Online]. Available: <http://www.fao.org/ag/AGAinfo/resources/documents/DW/Dw2.htm>.
- [9] R. Verma and S. Suthar, "Utility of Duckweeds as Source of Biomass Energy: a Review," *Bioenergy Res.*, vol. 8, no. 4, pp. 1589–1597, 2015.
- [10] E. Abuaku, K. A. Frimpong, B. A. Osei, and W. Verstraete, "Bio-Recovery of N and P from an Anaerobic Digester Effluent : The Potential of Duckweed (Lemna minor)," *West African J. Appl. Ecol.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, 2006.
- [11] J. Eastman, *The Book of Swamp & Bog: Trees, Shrubs, and Wildflowers of Eastern*, 1st ed. Stackpole Books, 1995.
- [12] H. J. Gijzen, "Low Cost Wastewater Treatment and Potentials for Re-use A Cleaner Production Approach to Wastewater Management," *Int. Symp. Low-Cost Wastewater Treat. Re-use, NVA-*

- WUR-EU-IHE, Febr. 3-4, 2001, Cairo, Egypt, p. 16, 2001.*
- [13] M. Ahmed, C. K. Hasan, H. Rahman, M. Ali Hossain, and S. A. Uddin, "Prospects of using wastewater as a resource-nutrient recovery and energy generation," *Am. J. Environ. Sci.*, vol. 11, no. 2, pp. 99–114, 2015.
- [14] B. Ingermasson, P. Oscarsson, M. . Ugglas, and C. . Larson, "Nitrogen utilization in Lemna: Short term effects of effects of ammonium on nitrate uptake and nitrate reduction.," *Pl. Physiol*, vol. 85, pp. 856–867, 1987.
- [15] Y. Yin *et al.*, "The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production," *Bioresour. Technol.*, vol. 187, pp. 84–90, 2015.
- [16] H. Paerl, "Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater – marine continuum," *Control*, vol. 223, no. 2007, pp. 217–237, 2008.
- [17] B. Markner-Jäger, *Water Quality*. 2008.
- [18] W. L. Schlesinger, "Biogeochemistry - An analysis of global change," no. September, p. 588, 1997.
- [19] H. Ishizawa, M. Kuroda, M. Morikawa, and M. Ike, "Evaluation of environmental bacterial communities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, 2017.
- [20] A. D. Eaton, L. S. Clesceri, E. W. Rice, and A. E. Greenberg, *Standard Methods for the examination of water & wastewater*. 2005.
- [21] C. Arnáiz, L. Isac, and J. Lebrato, "Determinación de la biomasa en procesos biológicos," *Tecnol. del agua*, pp. 45–52, 2000.
- [22] B. Díez-Martín, J. Navarro-Pedreño, and I. Meléndez-Pastor, "EL PALMERAL DE ELCHE Y SU IMPLICACIÓN EN EL CAMBIO CLIMÁTICO," 2009.
- [23] D. I. Arnon, "Copper Enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*," *Plant Physiol.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–16, 1948.
- [24] StatSoft, *Electronic Statistics Textbook*. Tulsa (OK), EE.UU, 2013.
- [25] I. Amorós Zaragoza, I. Meléndez Pastor, and J. Navarro-Pedreño, "Modelización de la calidad de aguas en cursos de agua eutrofizados," 2015.
- [26] D. G. Smith and R. Maasdam, "New Zeland's National River Water Quality Network1. Design and physic-chemical characterisation.," *N Z J Mar Freshw. Res*, vol. 28, pp. 19–35, 1994.

- [27] K. R. Reddy and W. F. De Busk, "Nutrient removal potential of selected aquatic macrophytes," *J. Environ. Qual.*, vol. 14, no. 4, pp. 459–462, 1985.

6.2. Recursos de internet

ACSESS. Alliance of Crop, Soil and Environmental Science Societies. The Capacity of Duckweed to Treat Wastewater. URL: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jeq/abstracts/32/5/1583>

FAO. Food and Agriculture Organization. Duckweed: A tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment. URL:

<http://www.fao.org/ag/againfo/resources/documents/DW/Dw2.htm>

ILA. International Lemna Association. URL: <http://www.internationallemnaassociation.org/>

MAMAGRANDE. Empresa social biotecnológica Argentina que regenera servicios ecosistémicos. URL: <http://mamagrande.org/>

MOBOT. The Charms of Duckweed. An introduction to the smallest flowering plants by Jonh W. Cross. URL: <http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/duckweed.htm>

LEMNAPEDIA. Duckweed research and applications. URL: <http://lemnapedia.org/wiki/LemnaPedia>

RDSC. Rutgers Duckweed Stock Cooperative. ISCDRA. International Conference on Duckweed Research and Applications. URL: <http://www.ruduckweed.org/>