

## Comparación de las características poblacionales de *Lemna minuta* (ARACEAE: LEMNOIDEAE) en tres medios de cultivo

### Comparison of the populational characteristics of *Lemna minuta* (ARACEAE: LEMNOIDEAE) in three culture media

Daniel Ferley Ramírez-Babativa\*, Adriana Janneth Espinosa Ramírez\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.50511

#### RESUMEN

Las investigaciones en macrófitas acuáticas neotropicales son escasas, principalmente en Colombia comparadas con países como Brasil, aunque se consideran comunidades apropiadas en diversas aplicaciones por su gran capacidad reproductiva y alta sensibilidad a condiciones cambiantes del ambiente. Se propuso aclimatar y cultivar un clon de *Lemna minuta*, lenteja de agua flotante de amplia distribución en Colombia y América. Sus frondas hijas se mantuvieron dos meses en el medio de cultivo APHA y posteriormente se comparó su propagación en tres medios de cultivo: Hoagland's E+, APHA y AAP20x. Se analizaron variables de crecimiento poblacional como tasa de crecimiento, mortalidad, tiempo de duplicación y tiempo de vida. Adicionalmente, se evaluó la eficiencia del método de limpieza de frondas propuesto por Acreman para obtener cultivos axénicos. Los resultados indicaron que el medio Hoagland's E+ (sin compuestos orgánicos) es el más adecuado para el crecimiento de las frondas en condiciones de laboratorio, debido a su mayor tasa de producción de frondas (0,16 frondas·d<sup>-1</sup>) y tiempo de vida (13,8 días), con menor mortalidad (0,11 frondas·d<sup>-1</sup>) y tiempo de duplicación (4,61 días). Conocer los parámetros de crecimiento poblacional y las condiciones de cultivo de *L. minuta* permiten proponerla como una macrófita relevante y candidata para diversos bioensayos de calidad de agua.

**Palabras clave:** medios de cultivo, tasa de crecimiento, propagación, lentejas de agua, *Lemna minuta*.

#### ABSTRACT

Although neotropical macrophytes are considered appropriate for diverse applications due to their great reproductive capacity and high sensitivity to changing environmental conditions, research on these plants is currently scarce, especially in Colombia when compared to countries such as Brazil. The current research work intended to acclimatize and cultivate a clone of the duckweed *Lemna minuta*, which is widely distributed in Colombia and America. After keeping daughter fronds of this species for

\* Biólogo, Magister en Ciencias. Instituto de Ecología A.C. (INECOL), Ecología Funcional, Xalapa-Enríquez, Ver., México. danielferley@gmail.com.

\*\* Bióloga, Magister en Ciencias microbiología, PhD(c) Salud Pública. Docente e investigadora Grupo Unidad de Ecología en Sistema Acuáticos UDESA. Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia. Adriana.espinosa@uptc.edu.co.

two months in APHA culture medium, their propagation was compared in three culture media: Hoagland's E+, APHA and AAP20x. Population growth variables such as growth rate, mortality, doubling time and life span. Additionally, the efficiency of the frond cleaning method proposed by Acreman to obtain axenic cultures was evaluated. The results indicated that Hoagland's E+ medium (without organic compounds) is the most suitable one when it comes to frond growing under laboratory conditions, due to its associated higher frond production rate ( $0.16 \text{ fronds} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and life span (13.8 d), as well as lower mortality ( $0.11 \text{ fronds} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and doubling time (4.61 d). Knowing the population growth and cultivation conditions of *L. minuta* allows proposing it as a relevant macrophyte and candidate for various water quality bioassays.

**Key words:** culture media, growth rate, propagation, duckweed, *Lemna minuta*.

**Recibido:** agosto 10 de 2017

**Aprobado:** mayo 24 de 2018

## INTRODUCCIÓN

Las macrófitas acuáticas cumplen un papel importante en la estructura y función de los ecosistemas acuáticos por ser organismos fotosintetizadores y por mantener y conservar la diversidad faunística de invertebrados, peces, aves y mamíferos; sin embargo, diferentes amenazas a las aguas dulces, por ejemplo, el cambio climático o la eutrofización (Chambers *et al.*, 2008), generarán afectaciones importantes a su diversidad y abundancia. Las macrófitas actualmente son de interés para la obtención de biocombustibles como biogás, bioetanol y butanol debido a sus altas tasas de crecimiento y acumulación de almidones (Cui & Cheng, 2015). La mayoría de estudios en macrófitas para el neotrópico reconocen diversidad de especies (Ramos *et al.*, 2013), evalúan calidad del ambiente en poblaciones y comunidades, e identifican variables que afectan el crecimiento, tasas de descomposición (Carrillo *et al.*, 2006) y aquellos relacionados con el control y manejo en ambientes eutrofizados culturalmente. La literatura para América Latina aumentó notablemente en las últimas dos décadas, siendo Brasil, Argentina, México y Chile aquellos que más información generan sobre esta comunidad (Padial *et al.*, 2008). No obstante, los estudios sobre bioacumulación de sustancias tóxicas en esta comunidad es bajamente representado en la productividad científica regional (Carriquirri-borde & Bayne, 2012), aunque existen reportes en Colombia como Caviedes *et al.* (2016), que indican su capacidad para remover diferentes metales pesados en aguas residuales. En este sentido, este trabajo es una contribución para Colombia en aspectos relacionados con el cultivo y propagación de una macrófita ampliamente utilizada como organismo indicador de toxicidad por diversas auto-ridades ambientales a nivel global, como la Organi-

zación para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD) y el Ministerio de Ambiente de Canadá (Environment Canada o EC), quienes señalan las bondades en el uso de diversas especie de *Lemna* para estas aplicaciones (OECD, 2006; EC, 2007).

La subfamilia Lemnoideae (Araceae) es reconocida por tener una amplia distribución de especies acuáticas en el mundo, comúnmente conocidas como lentejas de agua (Cross, 2002). Lemnoideae está compuesta por cinco géneros y cerca de 40 especies, de las cuales 15 se presentan en Colombia (Stevens, 2008; Landolt & Schmidt-Mumm, 2009). Son plantas acuáticas diminutas que han reducido sus órganos vegetativos (hoja, tallo y raíz) y reproductivos (flor y fruto), asemejándose a organismos taloides con raíces muy pequeñas o ausentes. La mayoría se caracterizan por ser flotantes y presentarse en sistemas dulceacuícolas como lagos, lagunas, pozas de quebradas o en aguas estancadas (Armstrong, 2001). Se reproducen casi exclusivamente por propágulos asexuales, que se desarrollan por la ramificación y la subsecuente fragmentación del tallo en unidades separadas llamadas "frondas" (Lemon & Posluszny, 2000). Esta reproducción vegetativa es común dentro de las poblaciones y les permite establecer densas agrupaciones que forman tapetes sobre los espejos de agua (Landolt, 1998). Como resultado de este tipo de crecimiento, existe una alta variabilidad en las tasas de reproducción vegetativa de las lentejas de agua, pero estos valores se han presentado en términos poblacionales de colonias, y raramente han sido expresados en función de las frondas (Lemon *et al.*, 2001).

El uso experimental de especies de Lemnoideae comenzó en 1920 dentro de investigaciones fisiológicas en plantas acuáticas, con las especies *Lem-*

*na minor* L. y *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. El crecimiento flotante de algunas especies ha permitido reconocer y analizar su posible susceptibilidad a diferentes sustancias tóxicas presentes en la columna del agua. Principalmente se utilizaron para estudiar los efectos de sustancias que contaminan el ambiente acuático, como tensoactivos, pesticidas y metales pesados (Landolt & Kandeler, 1987; Landolt & Schmidt-Mumm, 2009). También se evaluaron como aditivos en la dieta de animales (Arroyave, 2004; Chojnacka, 2006) y en el tratamiento de aguas residuales (Dalu & Ndamba, 2003; Caviedes et al., 2016), además se ha enfocado su uso como indicadores de toxicidad y genotoxicidad en aguas superficiales (Radic et al., 2011). Una clásica revisión de experimentos en laboratorio con especies de Lemnoideae se encuentra en W. Hillman (1961) y en la monografía de E. Landolt (1986).

Las diferentes aplicaciones de *Lemna* en el área de toxicología acuática se han enfocado principalmente en la realización de pruebas de toxicidad. La OECD y el Ministerio de Ambiente de Canadá (EC) han recomendado el uso de *Lemna gibba* y *Lemna minor* en la realización de dichos ensayos, por lo cual han desarrollado algunos protocolos de cultivo utilizados a nivel internacional (OECD, 2006; EC, 2007). En estos se promueve la adquisición de cepas referenciadas de *Lemna* en centros de investigación, o se sugiere la obtención y desarrollo de monocultivos de especies nativas para su experimentación. Como resultado, los investigadores que deseen desarrollar ensayos con macrófitas se enfrentan a la necesidad de adquirir un monocultivo de *Lemna*, y con ello a las posibles restricciones legislativas de importación y costos económicos por su compra.

La opción de usar a nivel experimental especies de amplia distribución presenta ventajas para el desarrollo y mantenimiento de bioensayos, como requerir únicamente las instalaciones y los equipos comunes en los laboratorios de ecotoxicología (Díaz-Báez et al., 2004), a pesar de requerir mayor tiempo en la obtención de un monocultivo. Por consiguiente, conocer las características del crecimiento vegetativo de especies de *Lemna* bajo condiciones experimentales es fundamental para iniciar ensayos con contaminantes acuáticos. Los objetivos del estudio fueron: 1) establecer un monocultivo de la especie nativa *Lemna minuta*, y 2)

evaluar su crecimiento vegetativo a través de tres medios de cultivo recomendados: Hoagland's E+, APHA y AAP20x.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aclimatación y condiciones generales de cultivo

Las colonias de *Lemna minuta* Kunth (1816) fueron colectadas en el humedal de Santa María del Lago en Bogotá (4°41'41.5" N 74°05'43.8" W) (SDA, 2010) y se identificaron mediante la clave taxonómica de Landolt & Schmidt-Mumm (2009). Las colonias, formadas de dos a cuatro individuos o frondas, se mantuvieron para su aclimatación en un vaso de precipitado de dos litros con 1,5 litros de agua del humedal (pH=7,8; oxígeno disuelto=5,3 mg·L<sup>-1</sup>; conductividad=4,9 μs·cm<sup>-1</sup>, temperatura=20°C) durante dos meses, con una renovación semanal del agua (zona de moderada contaminación) sin ningún tratamiento (EC, 2007). Para formar un cultivo base o stock, se seleccionó bajo estereoscopio una fronda sin clorosis o necrosis, y con una contaminación mínima en fronda y raíz por organismos como algas y cianobacterias. Para formar el monocultivo, todas las frondas provinieron de esta única fronda o clon, conocida como fronda madre (Landolt, 1986; EC, 2007). Esta se propagó en frasco de vidrio claro de 200 mL, esterilizado y sellado con Parafilm M®, con renovación semanal de 100 mL de medio APHA (EC, 2007), usado por la menor concentración de nutrientes respecto del medio AAP (OECD, 2006). Posteriormente, las nuevas colonias formadas a partir de las frondas hijas se separaron a un nuevo frasco cuando cubrían más del 50 % de la superficie del medio, para permitir un rápido crecimiento sin restricción por espacio (Szabó et al., 2003). El cultivo stock y los medios de cultivo se mantuvieron en cabinas de incubación con condiciones controladas de temperatura de 24 ± 0,5 °C, fotoperíodo de 16/8 horas, y luz blanca fría con intensidad lumínica de 1500-2000 luxes.

### Limpieza de frondas

Para obtener el monocultivo de *L. minuta* se empleó el método de limpieza de frondas de Acreman (OECD, 2006; EC, 2007) cuando se alcanzó un cultivo stock aproximado de 400 frondas. El método se modificó para este trabajo debido a la alta sensibilidad de *L. minuta* (clorosis) y a los altos índices de mortalidad durante su ejecución (>95%), por lo cual se disminuyó el tiempo de ex-

posición al agente desinfectante (solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %) de un minuto a 30 segundos, con el cual se buscaba eliminar bacterias y microalgas acompañantes en el biofilm de la fronda. Posterior al tratamiento, las frondas fueron traspasadas al medio APHA y luego a los medios de cultivo para su seguimiento vegetativo.

Dado que las frondas de *L. minuta* provenían de un humedal y que a pesar del proceso de desinfección aún se presentaba contaminación de algas acompañantes, para formalizar un criterio del estado de contaminación de las frondas en el cultivo, se establecieron tres categorías a partir de la densidad de algas (células·mL<sup>-1</sup>) de los micropozos: alta (mayor a 1,0 x 10<sup>7</sup>), media (entre 1,0 x 10<sup>6</sup> y 1,0 x 10<sup>7</sup>) y baja (menor a 1,0 x 10<sup>6</sup>). Para evaluar el grado de contaminación con microbiota acompañante se realizaron los conteos algales en dos tiempos para cada medio sin renovación: siete y catorce días (EC, 2007). Se utilizó un hemocitómetro (0,2 mm de profundidad) y un microscopio óptico (Nikon® Eclipse E200, aumento 400x) para determinar la densidad algal. La identificación de algas se realizó hasta nivel de género utilizando la clave taxonómica de Bellinger & Sigeo (2010).

### Crecimiento vegetativo en medios de cultivos

Se eligieron tres medios de cultivo para evaluar el crecimiento de *L. minuta*: medio modificado APHA (EC, 2007) y medio modificado de Hoagland´s E+ (EC, 2007), conocido como HE+ (sin sustancias orgánicas), que son los recomendados para el crecimiento de *L. minor*; y el medio AAP20x (OECD, 2006), recomendado y utilizado para la propagación de *L. gibba*. Para el seguimiento en el número de frondas, se realizaron cuatro ensayos estáticos (sin renovar los medios) continuos con duración de siete días. Se evaluaron utilizando microplacas Falcon® de 12 pozos de 5 mL. En cada pozo se agregó 4,5 mL de medio y una colonia al azar del cultivo stock en APHA, teniéndose así en total 48 réplicas por tratamiento (n=144). Antes de introducir las frondas a los medios de cultivo, éstas se separaban de las frondas madre para adquirir colonias de igual tamaño y tiempo de vida, y así obtener baja variabilidad en las tasas de crecimiento (coeficiente de variación menor a 30%) (Díaz-Báez et al., 2004). La manipulación y transferencia de las frondas se realizaron en un ambiente aséptico generado por una cámara de flujo laminar (Acreman, 2007).

Las variables de respuesta de *L. minuta* fueron cinco: tasa de crecimiento y de mortalidad, tiempo de duplicación, tiempo de vida de la fronda madre y número específico de frondas hijas producidas. Las tasas de crecimiento ( $\mu$ ) y mortalidad ( $t_m$ ) se determinaron mediante el seguimiento del número de frondas antes y después de los siete días de exposición al medio de cultivo. Estas se calcularon con base en el cambio del número de frondas en el tiempo (expresado en días) para cada uno de los tratamientos. También es conocida como tasa de crecimiento específica (EC, 2007):

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln N_j - \ln N_i}{t_j - t_i}$$

Donde  $\mu_{i,j}$  es el valor de la tasa de crecimiento específica desde el tiempo  $i$  al  $j$ , la diferencia  $N_j - N_i$  corresponde al número de frondas observadas de cada pozo en las microplacas, y la diferencia  $t_j - t_i$  es el tiempo transcurrido en las mediciones (OECD, 2006). Para la  $t_m$  se utilizó la misma ecuación contando las frondas con clorosis total o necrosis (EC, 2007). El tiempo de duplicación ( $t_d$ ) es una variable que sirve como referencia para establecer el tiempo en que la población de *L. minuta* se reproduce vegetativamente hasta obtener el doble de frondas. Se determinó mediante la fórmula  $t_d = \ln 2 / \mu$ . La producción de frondas hijas ( $P_i$ ) corresponden al número de frondas hijas producidas por una sola fronda madre. El tiempo de vida ( $t_v$ ) es el lapso de tiempo que vive la fronda sin presentar clorosis o necrosis completa. El  $t_v$  se extrapolaron a mediciones anuales para comparaciones con otras especies de Lemnoideae.

### Análisis estadístico

Las variables de respuesta fueron evaluadas para diferencias significativas entre los medios de cultivos mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney, después de corroborar la ausencia de distribución normal y homogeneidad de varianzas con las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene. Un valor de  $p < 0,05$  fue utilizado como criterio para considerar diferencias significativas. Los análisis se desarrollaron con el software R versión 3.0.2 (2013).

**Tabla 1.** Comparación de la composición entre medios de cultivo y otras condiciones físico químicas. (\*) Indica los compuestos orgánicos que se eliminaron del medio para promover un monocultivo axénico.

Sustancia	APHA (mg·L <sup>-1</sup> )	AAP20x (mg·L <sup>-1</sup> )	Hoagland's E+ (mg·L <sup>-1</sup> )	Elemento
NaNO <sub>3</sub>	255	510		Na, N
NaHCO <sub>3</sub>	150	300		Na, C
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.4	30		K, P
KCl	10.1			K
CaCl <sub>2</sub>	44,1	90		Ca
MgCl <sub>2</sub>	121,7	240		Mg
MnCl <sub>2</sub>	4,15	8,3	3,62	Mn
FeCl <sub>3</sub>	1,6	3,2		Fe
MgSO <sub>4</sub>	147	290	500	Mg, S
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1,86			B
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,0726	0,145	0,12	Mo
ZnCl <sub>2</sub>	0,0327	0,066		Zn
CoCl <sub>2</sub>	0,0078	0,029		Co
CuCl <sub>2</sub>	9 x 10 <sup>-5</sup>	2,4 x 10 <sup>-4</sup>		Cu
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>			1180	Ca, N
KNO <sub>3</sub>			1515,2	K, N
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			680	K, P
Acido Tartárico			3	
Na <sub>2</sub> EDTA		6,0	67	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		3,7	2,86	B
ZnSO <sub>4</sub>			0,22	Zn, S
CuSO <sub>4</sub>			0,08	Cu, S
Sucrosa*			10 g·L <sup>-1</sup>	
Extracto Levadura*			0,1 g·L <sup>-1</sup>	
Bactotripton*			0,6 g·L <sup>-1</sup>	
pH	8,3 ± 0,1	7,5 ± 0,1	4,6 ± 0,1	
Esterilización	No	No	Si (Autoclave)	
Agua	Deionizada	Deionizada	Deionizada	

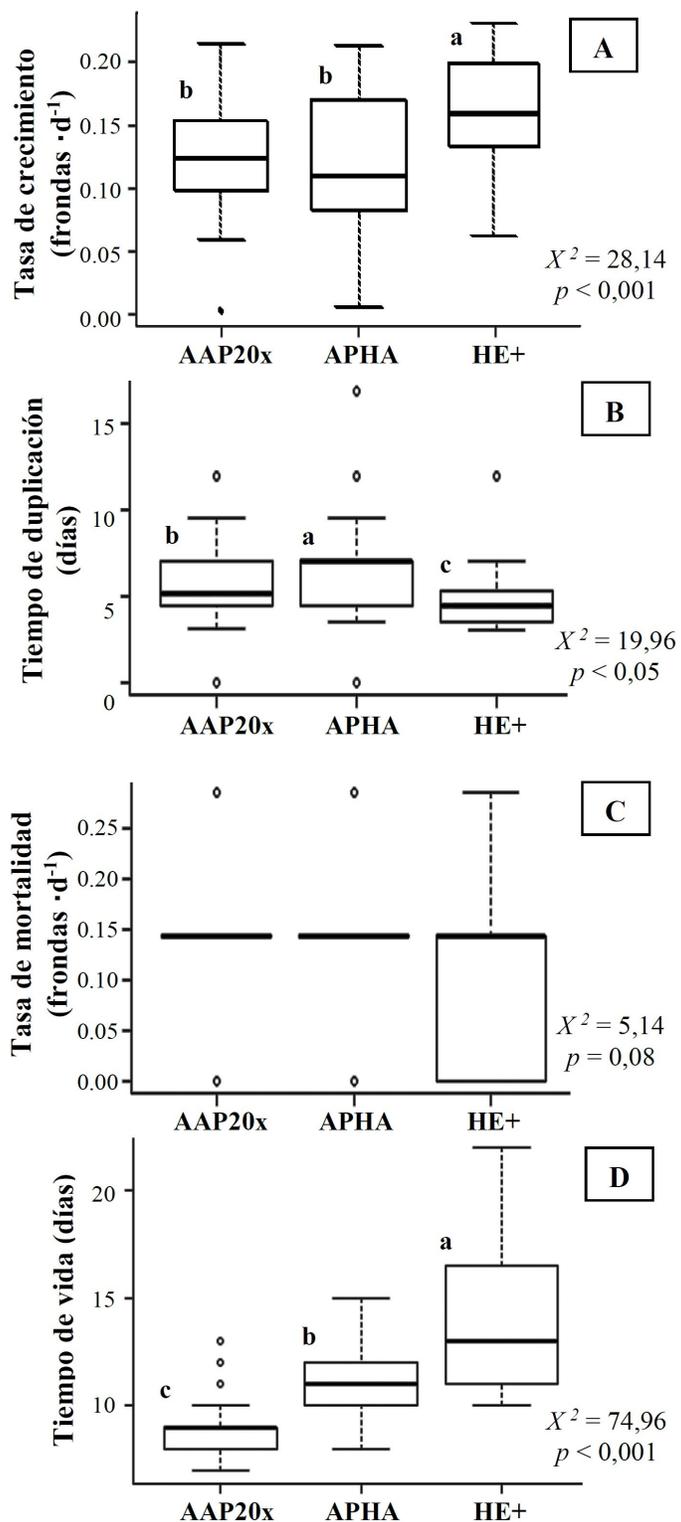
## RESULTADOS

La composición química de los tres medios de cultivo evaluados para *L. minuta* y sus versiones modificadas (APHA, AAP20x y HE+) se caracterizaron por no incluir compuestos orgánicos (tabla 1), debido a que estos promovían el crecimiento de algas y bacterias y dificultaban la obtención del cultivo axénico. Las evaluaciones de las variables de crecimiento presentaron algunos contrastes entre los tres medios de cultivo (tabla 2). Se obtuvieron

diferencias significativas entre la tasa de crecimiento (Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ), el tiempo de duplicación (Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ) y el tiempo de vida (Kruskal-Wallis,  $p < 0,001$ ), mientras no se encontraron diferencias significativas sobre la tasa de mortalidad (Kruskal-Wallis,  $p = 0,08$ ) (figura 1).

### Contaminación de frondas

El método de limpieza de Acreman no fue efectivo en la obtención de un monocultivo axénico de *L. minuta*, debido a que se encontraban reiterada-



**Figura 1.** Comparación entre los tres medios de cultivo de las tasas de crecimiento (A), los tiempos de duplicación (B), de mortalidad (C), y de vida (D) para *L. minuta*. Las letras minúsculas indican las diferencias significativas (prueba de Mann-Whitney).

mente altas densidades de algas después de su realización y seguimiento (tabla 3). Se evaluó la concentración de hipoclorito y el tiempo de exposición, sin embargo se presentaron algas clorofíceas unicelulares que resultaron resistentes al tratamiento con hipoclorito (0,5%) durante 30 segundos. Se evidenciaron siete clorofíceas (*Sphaerocystis* sp., *Chlorococcum* sp., *Tetraspora* sp., *Scenedesmus* sp., *Pleurococcus* sp., *Elakatothrix* sp. y *Chorella* sp.) y una cianobacteria (*Microcystis* sp.). En el día siete el medio AAP20x presentó la mayor densidad algal con  $3,3 \times 10^5$  células·mL<sup>-1</sup>, seguido del medio Hoagland's E+ con  $3,1 \times 10^5$  células·mL<sup>-1</sup>. La menor densidad se presentó en el medio APHA con  $1,0 \times 10^5$  células·mL<sup>-1</sup>. En el día catorce se presentó la menor densidad en el medio Hoagland's E+ con  $7,1 \times 10^6$  células·mL<sup>-1</sup>, mientras el medio AAP20x continuó presentando la mayor densidad con  $1,7 \times 10^7$  células·mL<sup>-1</sup>, seguido del medio APHA con  $1,1 \times 10^6$  células·mL<sup>-1</sup>. La presencia de estos organismos acompañantes se pensaba podría competir con las frondas de *L. minuta*, sin embargo, este tema se debe revisar ya que estudios recientes indican que la presencia de biopelículas, por ejemplo bacterianas, en co-cultivo pueden favorecer el crecimiento de las biomasa de *L. minuta* (Ishizawa et al., 2017) fenómeno no evaluado en este trabajo.

### Reproducción vegetativa

La mayor tasa de crecimiento se obtuvo en el medio Hoagland's E+ con 0,16 frondas·d<sup>-1</sup>, seguida de AAP20x con 0,12 frondas·d<sup>-1</sup> y el medio APHA, con 0,11 frondas·d<sup>-1</sup>. Las comparaciones mediante la prueba de Mann-Whitney indican una tasa significativamente mayor en el medio Hoagland's E+ respecto a AAP20x ( $p < 0,001$ ), y APHA ( $p < 0,001$ ), mientras que las tasas de los medios APHA y AAP20x no tienen diferencia significativa ( $p = 0,10$ ).

La mayor tasa de mortalidad ( $\mu_{tm}$ ) se presentó en AAP20x con 0,14 frondas·d<sup>-1</sup>, seguida de APHA con 0,12 frondas·d<sup>-1</sup>, y el menor valor se obtuvo con Hoagland's E+ con 0,10 frondas·d<sup>-1</sup>. El menor tiempo de duplicación ( $\mu_{td}$ ) se obtuvo en el medio Hoagland's E+ con 4,62 días, seguido de AAP20x con 5,60 días, mientras el medio APHA presentó el mayor tiempo con 6,96 días (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). El tiempo de vida ( $\mu_{tv}$ ) más alto se presentó con Hoagland E+ con 13,81 días, seguido del medio APHA con 11,29 días, y el AAP20x presen-

tó el menor tiempo con 8,98 días (Mann-Whitney,  $p < 0,001$ ). *L. minuta* presentó una producción de frondas hijas ( $P_i$ ) en promedio de 3,2 por cada fronda madre en Hoagland's E+, siendo cuatro veces menor que la especie de referencia *L. minuta* (tabla 4). Los valores presentados aquí son un aporte en el avance en el aislamiento, aclimatación y propagación de *L. minuta* a partir de las frondas de los humedales de Bogotá, con el fin de potenciar el uso de macrófitas para bioensayos en laboratorios locales u otras potenciales aplicaciones.

### DISCUSIÓN

Para el aislamiento y propagación de un cultivo de *L. minuta* fue indispensable desarrollar un protocolo sobre su crecimiento vegetativo bajo condiciones controladas de laboratorio, evaluar el crecimiento en diferentes medios de cultivo y conocer una metodología de limpieza para las frondas como punto de partida para obtener valores de referencia para cualquier uso experimental (Einhelling et al., 1985; Landolt, 1986; Christen & Theuer, 1996).

El tiempo de aclimatación de ocho semanas para las frondas colectadas de *L. minuta* se consideró suficiente para obtener un gran número de frondas (> 500) e iniciar la evaluación del método de limpieza de Acreman y la comparación del crecimiento vegetativo en los medios Hoagland's E+, APHA y AAP20x. La renovación semanal de los medios del cultivo stock en el medio APHA se consideró apropiada, ya que permitió que las nuevas frondas continuaran sus tasas reproductivas frente a las nuevas condiciones ambientales dentro de las cámaras de incubación (Bergman et al., 2000; Moody & Miller, 2001; Kufel et al., 2010). Landolt (1986) y Wang (1990, 1991) explican que las diferencias entre los valores de aclimatación y crecimiento de *L. minuta* respecto a otras plantas acuáticas se deben a las condiciones experimentales en las cámaras de crecimiento, la composición química de los medios de cultivo seleccionados (sin compuestos orgánicos), y la plasticidad fenotípica característica de los clones de las especies de *Lemna*. Adicionalmente, la comparación de las tasas de crecimiento de *L. minuta* en diferentes medios de cultivo proporciona datos preliminares que permiten valorar si esta especie podría ser útil en ensayos de toxicidad acuática, origen del trabajo presentado.

**Tabla 2.** Valores promedio de las variables poblacionales ( $\pm$  desviación estándar).  $td_a$  indica las veces que la población se duplica durante un año (365 días).

Variable de crecimiento	Medio de cultivo		
	AAP20x	APHA	HE+
Tasa de crecimiento (frondas·día <sup>-1</sup> )	0,12 (0,05)	0,11 (0,05)	0,16 (0,04)
Tasa de mortalidad (frondas·día <sup>-1</sup> )	0,14 (0,09)	0,11 (0,07)	0,11 (0,08)
Tiempo de vida (días)	8,98 (1,31)	11,29 (1,59)	13,81 (3,28)
Tiempo de duplicación (días)	5,60 (2,27)	6,96 (3,58)	4,61 (1,56)
Duplicación anual ( $td_a$ )	71,4	63,4	92,8

### Condiciones de cultivo y limpieza de frondas

Las diferencias entre los valores de crecimiento vegetativo obtenidos en este estudio respecto a los encontrados para otras especies de *Lemna* pueden deberse a algunas condiciones ambientales en las que se desarrollaron los cultivos (Lemon *et al.*, 2001; Szabó *et al.*, 2005; Roijackers *et al.*, 2004). La intensidad de la luz propuesta en los protocolos de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico y el Ministerio de Ambiente de Canadá (4000-5600 luxes, equivalentes a 64-90  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) es aproximadamente el doble de la utilizada en este trabajo. La luz es el principal factor de competencia con otras especies fotosintéticas acuáticas como las microalgas, y la intensidad más baja evitó que esas poblaciones crecieran más rápido que las frondas, y con ello disminuirían la disponibilidad de nutrientes en los medios de cultivo (Szabó *et al.*, 1998; Roijackers *et al.*, 2004). Adicionalmente, la utilización de luz blanca fría fue acertada al no ocasionar una amplia variación en la temperatura de la cámara de incubación ( $24 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ).

Al aplicar un fotoperíodo de 16/8 horas se evitó una mayor contaminación del cultivo por algas clorofíceas y cianobacterias durante el desarrollo del cultivo no axénico, aún después de aplicar el método de limpieza de Acreman (Szabó *et al.*, 2003; Lemon *et al.*, 2001; Roijackers *et al.*, 2004). Para esto se debe utilizar una menor concentración de 0,5 % de hipoclorito y tiempos menores de exposición a 30 segundos para limpiar las frondas y realizarlo sucesivamente para eliminar algas como *Chlorococcum* sp. y *Chorella* sp. (Szabó *et al.*, 2005).

### Reproducción vegetativa

A partir de los valores obtenidos de las tasas de crecimientos y mortalidad en los tres medios de cultivo (APHA, AAP20x y HE+), se puede afirmar que para realizar cultivos de *L. minuta* resulta conveniente utilizar el medio Hoagland's E+, debido a que favorece crecimiento y se presenta baja mortalidad (figura 1). Igualmente, en este medio se presentan los mayores tiempos de vida, beneficiando la viabilidad de las frondas del cultivo, a diferencia de los medios APHA y AAP20x, donde se evidenciaron problemas de inhibición de crecimiento por alta mortalidad y menores tasas de crecimiento. Estos resultados concuerdan con el protocolo para diferentes especies de *Lemna* desarrollado por el Ministerio de Ambiente de Canadá (EC, 2007), en el cual recomiendan este medio por encima de otros, aunque todos tengan énfasis en su uso para *L. minor* y sus clones axénicos. De este modo, la selección del medio modificado Hoagland's E+, el cual no contiene sustancias orgánicas (tabla 1), es preferible para la propagación y mantenimiento de cultivos de la especie *L. minuta*, aún sin lograr un monocultivo axénico (Mohan & Hosetti, 1999; Roijackers *et al.*, 2004; APHA, 2008) como el que se obtuvo en este estudio.

### Producción de frondas, tiempos de duplicación y vida

Los bajos valores en el tiempo de duplicación en el medio Hoagland's E+ para *L. minuta* sirven como estimadores de las tasas de crecimiento para la futura realización de ensayos de ecotoxicidad, donde se valora esta característica en condiciones de exposición a agentes tóxicos y permitirá establecer el tiempo adecuado de los bioensayos

**Tabla 3.** Presencia y densidad promedio de algas en las frondas después de aplicar el método de limpieza de Acreman.

Filo y especies	Medio de cultivo		
	APHA	AAP20x	HE+
Chlorophyta			
<i>Sphaerocystis</i> sp.	x		
<i>Chlorococcum</i> sp.	x	x	x
<i>Tetraspora</i> sp.		x	
<i>Scenedesmus</i> sp.	x	x	
<i>Pleurococcus</i> sp.		x	
<i>Elakatothrix</i> sp.	x		
<i>Chlorella</i> sp.	x	x	x
Cyanobacteria			
<i>Microcystis</i> sp.	x	x	x
<b>Densidad total</b>			
7 días (células · mL <sup>-1</sup> )	1,00 x 10 <sup>5</sup>	3,30 x 10 <sup>5</sup>	3,05 x 10 <sup>5</sup>
14 días (células · mL <sup>-1</sup> )	1,11 x 10 <sup>7</sup>	1,71 x 10 <sup>7</sup>	7,05 x 10 <sup>6</sup>

**Tabla 4.** Comparación de los tiempos de vida de la fronda madre (tv), número de frondas hijas producidas (Pf) y de las tasas de crecimiento ( $\mu$ ) en cuatro especies

Taxa	t <sub>v</sub> (días)	Pf (número)	$\mu$ (frondas·día <sup>-1</sup> )
<i>Wolffia borealis</i> *	15,8	9,8	0,62
<i>Spirodela polyrhiza</i> *	12,1	1,1	0,08
<i>Lemna minor</i> *	31,3	14	0,45
<i>Lemna minuta</i>	13,8	3,2	0,16

(OECD, 2006; EC, 2007). Además, es útil como referencia para el mantenimiento de los cultivos, como el tiempo de renovación de los medios, la composición química (tabla 1) y determinar el tiempo de seguimiento en el laboratorio (Drost et al., 2007). De igual manera, el tiempo de duplicación anual (td<sub>a</sub>) sirve como un control del crecimiento de los cultivos en experimentos a largo plazo (Lemon et al., 2001; Moser & Pattard, 2009; Radic et al., 2011).

Los tiempos de vida estimados contribuyen al establecimiento de los posibles cambios del crecimiento de *L. minuta* para su propagación, y como parámetro de control dentro de los ensayos de toxicidad,

con la finalidad de definir el grado y extensión real de la contaminación por residuos en los ecosistemas acuáticos (Hillman, 1961; Jenner & Janssen-Mommen, 1993; Drost et al., 2007). Los resultados de la variación del crecimiento brindan una visión integrada de las características del crecimiento de *L. minuta* en laboratorio. Así, al comparar con otras especies usadas en bioensayos de calidad de aguas (tabla 4), algunas presentan mayores tasas de crecimiento en sus poblaciones, producen más propágulos y viven mayor tiempo (*L. minor*), o tienen una alta producción de frondas (*W. borealis*), mientras que *L. minuta* presenta baja producción de frondas y un tiempo de vida menor respecto a la especie más referenciadas en bioen-

sayos: *L. minor* (Jenner *et al.*, 1993; Bottcher & Schroll, 2007; Cedergreen *et al.*, 2007).

De este modo, las tasas obtenidas indican que previo a la realización de cualquier bioensayo u otro experimento, se debe contar con un amplio número de frondas de *L. minuta* ( $n > 500 = 120$  colonias de cuatro frondas). Con el  $t_d$  de 4,6 días obtenido en este estudio, se requieren 127 días (aproximadamente cuatro meses) para obtener más de 500 frondas. A nivel de frondas individuales, las diferencias en las tasas reproductivas encontradas pueden ser el resultado de un rápido desarrollo y posterior liberación de las frondas hijas, o de un tiempo de vida mayor. En algunos estudios sobre el crecimiento vegetativo poblacional de lentejas de agua (Lemon *et al.*, 2001; Szabó *et al.*, 2005; Radic *et al.*, 2011) solo miden las tasas de multiplicación o los cambios en la biomasa sobre el tiempo a nivel de colonias, y no abarcan la producción de frondas, por lo que los resultados presentados pueden ser una referencia en la realización de cultivos de *L. minuta*.

Este estudio fue realizado bajo condiciones que son favorables para la reproducción vegetativa, y como resultado representan un estimativo del tiempo de replicación ( $r$ ). Todos los estimados de tasas de crecimiento de *L. minuta* deben ser considerados en el contexto experimental bajo el cual fueron desarrollados (condiciones de laboratorio). Los valores absolutos podrían estar simplificados y sobreestimados de las tasas reales en una población natural, porque excluyen las influencias de inmigraciones, emigraciones, influencias del tiempo, variación interespecífica, herbivoría, densidad poblacional y competencia entre plantas por luz, nutrientes y espacio. Igualmente, los datos aquí presentados no se pueden extrapolar con la producción de frondas y el tiempo de vida de una población que se encuentra en condiciones naturales, ya que varios factores influyen en la liberación de frondas, como el viento, la acción del oleaje, la herbivoría, el paso de animales y de botes (Landolt, 1986; Lemon *et al.*, 2001).

## CONCLUSIONES

*L. minuta* es una especie adecuada como organismo de prueba para iniciar la realización de bioensayos de calidad de aguas, debido a su constante tasa de crecimiento, producción de frondas, y tiempo de duplicación en condiciones de laborato-

rio. Se resalta la necesidad de verificar las condiciones adecuadas para la obtención de monocultivos, al controlar parámetros ambientales como los aquí presentados y que los cultivos se desarrollen con el medio HE+ sin sustancias orgánicas, durante un período de tiempo mayor a dos meses, para poder estabilizar y obtener tasas de crecimiento mayores.

Este estudio es una fuente de información primaria para otros estudios con *L. minuta*, debido a que formaliza sus condiciones de cultivo en laboratorio y brinda información sobre tasas de crecimiento, que fortalecen la idea de proponer su uso como herramienta de evaluación toxicológica. Esta aplicación podrá avanzar a medida que se conozca su sensibilidad a contaminantes específicos en futuras investigaciones.

## RECOMENDACIONES

Para estudios con otros géneros de la subfamilia Lemnoidae (*Spirodela*, *Landoltia*, *Wolffia* o *Wolffielia*) se debe realizar un continuo seguimiento a los tiempos de aclimatación, y así conocer la variación de sus tasas de crecimiento. Los resultados presentados de *L. minuta* pueden diferir de otros estudios, debido a que la especie responde de manera desigual a condiciones ambientales como luz, temperatura y solutos del agua.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen cordialmente a la profesora MSc. Carmen Reyes (Universidad Nacional de Colombia) por sus observaciones en las versiones anteriores del presente documento. Al Dr. Elias Landolt (Q.E.P.D.) por compartir sus publicaciones de Lemnáceas. Al Laboratorio de Ingeniería Ambiental (Universidad Nacional de Colombia) por permitir el uso de los equipos, reactivos y los espacios necesarios para el desarrollo de los experimentos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acreman, J. (2007). Axenic culture techniques for *Lemna*. En: Environment Canada (EC). *Biological test method: test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte Lemna minor*. EPS1/RM/37. 2nd ed. Ottawa: Environmental Protection Publications, pp. 102-108.

- Armstrong, W. (2001). Wayne's Word Lemnaceae. [consultado 5 de febrero de 2011]. Disponible en: <http://waynesword.palomar.edu/1wayindx.htm>.
- Arroyave, M. (2004). La lenteja de agua (*Lemna minor* L.): una planta acuática promisoría. *Rev EIA*, 1, 33-38.
- Bellinger, E., & Sigeo, D. (2010). *Freshwater algae: identification and use as bioindicators*. London: Wiley-Blackwell. p. 137-240. DOI: 10.1002/9780470689554.
- Bergman, B., Cheng, J., Classen, J., & Stomp, A. (2000). *In vitro* selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. *Bioresour Technol.*, 73, 13-20. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00137-6.
- Böttcher, T., & Schroll, R. (2007). The fate of isoproturon in a freshwater microcosm with *Lemna minor* as a model organism. *Chemos*, 66, 684-689. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.087.
- Carrillo, Y., Guarín, A., & Guillot, G. (2006). Biomass distribution, growth and decay of *Egeria densa* in a tropical high-mountain reservoir (NEUSA, Colombia). *Aquatic Botany*, 85(1), 7-15, doi.org/10.1016/j.aquabot.2006.01.006.
- Carrquiriborde, P. & Bairy, A. C. D. (2012). Environmental toxicology and chemistry in Latin America. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(5), 931-934. doi:10.1002/etc.1801.
- Caviedes Rubio, D., Delgado, D.R. & Olaya Amaya, A. (2016). Remoción de metales pesados comúnmente generados por la actividad industrial, empleando macrófitas neotropicales. *Producción + Limpia*, 11 (2), 126-149 - DOI: 10.22507/pml.v11n2a11.
- Cederdreen, N., Abbaspoor, M., Sorensen, H., & Streibig, J. (2007). Is mixture toxicity measured on a biomarker indicative of what happens on a population level? A study with *Lemna minor*. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 67, 323-332. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2006.12.006.
- Chambers, P, Lacoul, P, Murphy, K, & Thomaz, S. (2008). Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. *Hydrobiol.*, 595, 9-26. DOI:10.1007/s10750-007-9154-6.
- Chojnacka, K. (2006). The application of multielemental analysis in the elaboration of technology of mineral feed additives based on *Lemna minor* biomass. *Talanta*, 70, 966-972. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.05.063.
- Christen, O., & Theuer, C. (1996). Sensitivity of *Lemna* bioassay interacts with stock-culture period. *J Chem Ecol.*, 22(6), 1177-1186. DOI: 10.1007/BF02027953.
- Cross, J. (2002). The charms of duckweed. [consultado 5 de febrero de 2011]. Disponible en: <http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/duckweed-charms.htm>.
- Cui, W., & Cheng, J. (2015). Growing duckweed for biofuel production: a review. *Plant Biol J.*, 17, 16-23. doi:10.1111/plb.12216.
- Dalu, J., & Ndamba, J. (2003). Duckweed based wastewater stabilization ponds for wastewater treatment (a low cost technology for small urban areas in Zimbabwe). *Phys Chem Earth.*, 28, 1147-1160. DOI: 10.1016/j.pce.2003.08.036.
- Díaz-Báez, M., Bustos, M., & Espinosa, A. (2004). *Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 116 p.
- Drost, W., Matzke, M., & Backhaus, T. (2007). Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemos.*, 67, 36-43.
- Einhellig, F., Leather, G., & Hobbs, L. (1985). Use of *Lemna minor* as a bioassay in allelopathy. *J Chem Ecol.*, 11(1), 65-72. DOI: 10.1007/BF00987606.
- Environment Canada (EC). (2007). *Biological test method: test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte Lemna minor*. EPS1/RM/37. 2nd ed. Ottawa: Environmental Protection Publications. 141 p.
- Hillman, W. (1961). The Lemnaceae or Duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *Bot Rev.*, 27(2), 221-287. DOI: 10.1007/BF02860083.
- Ishizawa, H., Kuroda, M., Morikawa, M, & Ike, M. (2017). Evaluation of environmental bacterial com-

- munities as a factor affecting the growth of duckweed *Lemna minor*. *Biotechnol Biofuels.*, 10, 62. DOI: 10.1186/s13068-017-0746-8.
- Jenner, H., & Janssen-Mommen, J. (1993). Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity of coal residues and polluted sediments. *Arch Environ Contam Toxicol.*, 25, 3-11. DOI: 10.1007/BF00230704.
- Kufel, L., Strzalek, M., Konieczna, A., & Izdebska, K. (2010). The effect of *Stratiotes aloides* L. and nutrients on the growth rate of *Lemna minor* L. *Aquat Bot.*, 92, 168-172. DOI: 10.1016/j.aquabot.2009.11.005.
- Landolt, E. (1986). *The family of Lemnaceae: a monographic study*. vol. 1. Zürich: Geobotanisches Institut der ETH. 71, 1-566.
- Landolt, E. (1998). Lemnaceae. In: Kubitzki K, editor. *The families and genera of vascular plants* vol. IV. Berlín, Germany: Springer-Verlag. p. 264-270.
- Landolt, E., & Kandeler, R. (1987). *The family of Lemnaceae: a monographic study*. vol. 2. Zürich: Geobotanisches Institut der ETH. 95: 1-638.
- Landolt, E., Schmidt-Mumm, U. (2009). *Lemnaceae*. Flora de Colombia. 24, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia; Bogotá D.C. 54 p.
- Lemon, G., & Posluszny, U. (2000). Comparative shoot development and evolution in the Lemnaceae. *Int J Plant Sci.*, 161(5), 733-748. DOI: 10.1086/314298.
- Lemon, G., Posluszny, U., & Husband, B. (2001). Potential and realized rates of vegetative reproduction in *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor*, and *Wolffia borealis*. *Aqua Bot.*, 70, 79-87. DOI: 10.1016/S0304-3770(00)00131-5.
- Mohan, B., Hosetti, B. (1999). Aquatic plants for toxicity assessment. *Environ Res. section A.*, 81, 259-274. DOI: 10.1006/enrs.1999.3960.
- Moody, M., & Miller, J. (2005). *Lemna minor* growth inhibition test. En: Blaise C., Féraud J-F, editors. *Small-scale freshwater toxicity investigations, toxicity test methods*. vol. 1. Netherlands: Springer. p. 271-298. DOI: 10.1007/1-4020-3120-3.
- Moser, H., & Pattard, M. (2009). *Lemna* growth inhibition test. En: Moser H., Römbke J., editors. *Ecotoxicological Characterization of Waste*. Germany: Springer. p. 137-144. DOI: 10.1007/978-0-387-88959-7.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). (2006). *Guidelines for the testing of chemicals: Lemna sp. Growth Inhibition Test*. 22 p. DOI: 10.1787/9789264016194-en.
- Padial, A., Bini, L., & Thomaz, S. (2008). The study of aquatic macrophytes in Neotropics: a scientiometrical view of the main trends and gaps. *Braz J Biol.*, 68, 1051-1059. DOI: 10.1590/S1519-69842008000500012.
- R. Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <http://www.R-project.org/>.
- Radic, S., Stipanicev, D., Cvjetko, P., Marijanovic, M., Sirac, S., & Pevalek-Kozlina, B., et al. (2011). Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 74(2), 182-187. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2010.06.011.
- Ramos Montaña, C., Cárdenas-Avella, N, & Herrera Martínez, Y. (2013). Caracterización de la comunidad de Macrófitas acuáticas en lagunas del Páramo de La Rusia (Boyacá-Colombia). *Ciencia en Desarrollo*, 4(2), 73-82.
- Roijackers, R., Szabó, S., & Scheffer, M. (2004). Experimental analysis of the competition between algae and duckweed. *Arch Hydrobiol.*, 160(3), 401-412. DOI: 10.1127/0003-9136/2004/0160-0401.
- Santamaría, L. (2002). Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. *Act Oecol.*, 23, 137-154. DOI: 10.1016/S1146-609X(02)01146-3.
- Schmidt-Mumm, U. (1998). *Vegetación acuática y palustre de la sabana de Bogotá*. Tesis de maestría. Bogotá: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. 181 p.

- Secretaria Distrital de Ambiente. (2010). Resolución 7773 de 22 diciembre de 2010. Por el cual se ajusta y aprueba el plan de manejo ambiental del Humedal Santa María del Lago y se adoptan otras disposiciones.
- Stevens, P. (2008). Angiosperm Phylogeny Website – APG II. Version 9 [consultado 5 de febrero de 2011]. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/>.
- Szabó, S., Braun, M., Balázsy, S., & Reisinger, O. (1998). Influences of nine algal species isolated from duckweed-covered sewage miniponds on *Lemna gibba*. *Aqua Bot.*, 60, 189-195.
- Szabó, S., Roijackers, R., & Scheffer, M. (2003). A simple method for analyzing the effects of algae on the growth of *Lemna* and preventing algal growth in duckweed bioassays. *Arch Hydrobiol.*, 157(4), 567-575. DOI: 10.1127/0003-9136/2003/0157-0567.
- Szabó, S., Roijackers, R., & Scheffer, M. (2005). The strength of limiting factors for duckweed during algal competition. *Arch Hydrobiol.*, 164, 127-140. DOI: 10.1127/0003-9136/2005/0164-0127.
- Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ Res.*, 52(1), 7-22.
- Wang, W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Pollut.*, 59, 381-400. DOI: 10.1007/BF00211845.