

El pH y la fuente nitrogenada como moduladores del crecimiento de la macrófita *Lemna sp.*

N. Morales¹, K. Arévalo¹ J. Ortega², B. Briceño², C. Andrade² y E. Morales^{2*}

¹Instituto para la Conservación del Lago de Maracaibo (ICLAM). Maracaibo, Venezuela.

²Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Resumen

El afloramiento excesivo de la planta acuática *Lemna* en el Lago de Maracaibo, Venezuela ha motivado el interés por estudiar los diversos factores ambientales que puedan controlar su crecimiento. Se reporta la influencia del pH (2; 3; 3,5; 4; 5; 6; 7; 9 y 10) sobre el crecimiento de *Lemna sp.* en cultivos, con diferentes fuentes nitrogenadas (NH_4Cl , NaNO_3 , urea y NH_4NO_3) a 1mM. Los bioensayos por triplicados en frascos de vidrio se iniciaron con 20 colonias equivalentes a 57 ± 4 frondes de *Lemna* en 250 mL de agua del lago filtrada a 4%, y enriquecida con medio de cultivo ALGAL. El crecimiento se determinó en función del número de frondes viables producidos. Todos los experimentos se realizaron a un fotoperíodo 12:12h, con una irradiancia de $86 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y el pH ajustado con NaOH o HCl 1N durante 23 días. *Lemna sp.* mantuvo su crecimiento a un pH entre 3,5-9. Sin embargo, pH extremos ($3,5 < \text{pH} > 9$) inducen efecto nocivo. El pH óptimo estuvo en función de la fuente nitrogenada, con el siguiente orden de crecimiento: urea, pH 4 > NH_4NO_3 , pH 4 > NaNO_3 , pH 7 > amonio, pH 5; con valores promedios de $1668,5 \pm 28,99$; $506 \pm 19,80$; $333,0 \pm 65,05$ y $182,5 \pm 44,55$ frondes, respectivamente. Asimismo, el pH ejerce influencia sobre la flora microalgal y fúngica asociada. Es decir, a pH ≥ 7 predomina el crecimiento de microalgas. En cambio entre 3,5 y 6 se induce el crecimiento de hongos fitopatógenos para la *Lemna*. Se demuestra que el pH y la fuente nitrogenada constituyen factores moduladores del crecimiento de *Lemna*.

Palabras clave: crecimiento, fuente nitrogenada, *Lemna sp.*, pH, úrea.

Introducción

Dentro del género *Lemna*, de la familia Lemnaceae encontramos a las llamadas lentejas de agua. Este gru-

po incluye además los géneros *Lemna*, *Spirodela*, *Landoltia*, *Wolffia* y *Wolffiella* con amplia distribución en

cuerpos de agua dulce (2).

Lemna puede crecer explosivamente hasta llegar a cubrir la superficie de lagunas, lagos o embalses eutrofizados (13); de tal manera, que pueden ejercer efectos negativos en la biodiversidad (10), y calidad del agua cuando son destinadas a acuicultura o riego (15). Sin embargo, su alta capacidad de remoción de nutrientes relacionada con su elevada tasa de crecimiento ha sido aprovechada para el tratamiento de aguas residuales en diversos países (1, 11, 26).

En el Lago de Maracaibo, Venezuela se ha descrito un masivo crecimiento de las lenteja de agua o *Lemna* spp., el cual ha llegado a cubrir mas de un 15% de la superficie lacustre y que en principio se piensa ha sido originado por un incremento de la disponibilidad inmediata de nutrientes, principalmente fósforo y nitrógeno procedentes de fuentes puntuales, tales como descargas de aguas residuales, efluentes industriales y de camaroneras, y de fuentes no puntuales como las de escorrentías y precipitación; con lo cual se ha producido un significativo impacto ambiental en detrimento de las actividades portua-

rias, de la vida planctónica y de otros organismos existentes en el Lago de Maracaibo (9).

Es imprescindible investigar las posibles causas que han generado el crecimiento excesivo de la *Lemna* en la superficie del Lago de Maracaibo, Venezuela. Por lo que, es de interés evaluar los factores ambientales que puedan limitar y optimizar su crecimiento. Así como, el de determinar posibles controles biológicos o químicos con la finalidad de diseñar estudios de prevención de afloramientos en condiciones naturales.

Entre los parámetros ambientales moduladores del crecimiento en lemnáceas que han sido considerados, se encuentran la influencia de fuentes nitrogenadas (4, 11, 17, 20), fosfato, pH (14) e irradiancia (12).

En virtud de la necesidad de evaluar los factores ambientales que puedan regular el crecimiento de las especies de *Lemna* productoras de este impacto ecológico, se ha estudiado el efecto combinado del pH y de fuentes nitrogenadas como parámetros esenciales en la regulación de su crecimiento en condiciones de laboratorio.

Materiales y métodos

Muestreo

Las plantas de *Lemna* fueron recolectadas en un muestreo realizado a orillas del Lago, sector Milagro Norte de la ciudad de Maracaibo y mantenidas en una laguna a cielo abierto con una cobertura de 25,82 m² en el Laboratorio de Piscicultura del Departamento de Biología, Facultad

Experimental de Ciencias de La Universidad del Zulia. Las muestras de *Lemna* fueron luego trasladadas a peceras en condiciones de laboratorio para su adaptación y mantenidas en monocapas con agua filtrada del lago.

La macrófita *Lemna* presenta 1 o más frondes con una sola raíz y puede formar asociaciones denominadas

colonias. Estas plantas se caracterizan por propagarse vegetativamente, por gemación produciendo por este medio, nuevos frondes, los cuales al disociarse de la colonia, aumentan el número de individuos (12).

Condiciones del bioensayo

Los cultivos de *Lemna* se realizaron en frascos de vidrio de 7,2 cm x13 cm y para ello se utilizaron 300 mL de agua del lago, recolectada en el Paseo del Lago Maracaibo-Venezuela previamente filtrada y enriquecida con medio de cultivo comercial ALGAL (3), constituida por los siguientes compuestos: $ZnCl_2$ 1 μ M, $ZnSO_4$ 100 μ M, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1 μ M, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 1 μ M, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,1 μ M, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,1 μ M, EDTA 26,40 μ M, citrato férrico 20 μ M, tiamina 35 μ g/L, biotina, B_{12} 3 μ /L y $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0,1mM. Las fuentes nitrogenadas urea, nitrato de amonio, nitrato de sodio y cloruro de amonio (Merck) fueron añadidas a una concentración de 1 mM. La relación N/P al inicio del experimento fue de 1:10. El pH, la salinidad y la conductividad del agua del lago utilizada fueron de 7,6 y 4‰ y 4500 μ Mhos respectivamente.

Para cada una de estas fuentes nitrogenadas se utilizó un pH de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 9,0 y 10,0 ajustado con NaOH o HCl 1N (16). Para cada fuente nitrogenada se utilizó un control por triplicado con un pH inicial de 6,0 y no ajustado durante el bioensayo.

Los bioensayos se iniciaron con 20 colonias de *Lemna* caracterizadas por presentar un promedio de 57 ± 4 frondes; 36 ± 6 raíces; $42,0 \pm 3,61$ mg de peso fresco y $0,879 \pm 0,031$ μ g. mg^{-1} de clorofila total relacionada con el peso

húmedo correspondiente a 20 colonias de la planta.

Las raíces de las plantas por colonia fueron seccionadas antes de iniciar el experimento con la finalidad de inducir crecimiento a las nuevas condiciones del cultivo expuestas y de eliminar el exceso de microflora algal asociada.

Todos los bioensayos por triplicado se mantuvieron a un fotoperíodo 12:12h con una irradiancia de 86 μ mol $q.m^{-2}.s^{-1}$, a $30 \pm 2^\circ C$, sin aireación y ajustados el pH diariamente con NaOH o HCl 1N durante 23 días (16).

Determinación del crecimiento

El crecimiento de *Lemna* se siguió cada cinco días en función del número de frondes verdes (7) y de acuerdo a cada pH y fuente nitrogenada utilizada. Los frondes con clorosis o necrosis no eran considerados para el recuento.

La tasa de crecimiento (μ) fue determinada según la ecuación $\mu = \ln X_2 - \ln X_1 / t_2 - t_1$, donde X_2 y X_1 corresponden al número de frondes verdes determinados en t_2 y t_1 y los valores de μ expresados en número de frondes por día (8). El tiempo de duplicación (td) requerido para duplicar el número de frondes por día fue calculado en relación a la ecuación $td: \ln 2 \cdot \mu^{-1}$.

Cuando las colonias de *Lemna* en monocapa cubrían todo el diámetro del frasco, se realizaba transferencia de la misma a otro envase de vidrio de mayor diámetro a fin de evitar inhibición del crecimiento por aglomeración de las colonias (18). El peso fresco era determinado después de ser secada cada planta o colonia

con papel secante y expresados en mg fronde⁻¹.

Hongos y microalgas asociadas a *Lemna*

La presencia de hongos y microalgas en los cultivos de *Lemna* fue monitoreada para cada pH y fuente nitrogenada. Los frascos de vidrios utilizados para el bioensayo no fueron revestidos por ningún material para permitir la entrada de iluminación al interior de cada frasco, y así estimular el crecimiento de las microalgas presentes en el agua del lago filtrada y en las plantas durante el desarrollo del bioensayo. La población de los microorganismos fotosintéticos a cada pH se determinó mediante recuento celular en cámara de Neubauer y expresada en $\times 10^3$

cel.ml⁻¹ mientras que el peso seco de la biomasa microalgal producida a pH 9 y 10 se determinó mediante deshidratación de las muestras a 100°C hasta peso constante y expresado en mg.ml⁻¹ (3).

Análisis estadístico

Los máximos valores del número de frondes correspondientes a cada pH óptimo fueron comparados mediante un ANOVA de una vía para la determinación de grupos significativamente diferentes. En todos los casos donde la prueba F resultó significativa, se empleó la prueba de rangos múltiples de Scheffé a un nivel de significancia del 95%, mediante el programa estadístico para Windows SPSS versión 10.

Resultados y discusión

Influencia del pH sobre el crecimiento en función de la fuente nitrogenada

La macrófita *Lemna* sp productora del afloramiento excesivo en el Lago de Maracaibo, Venezuela mantuvo su crecimiento en un amplio rango de pH entre 3,5 y 9; pero con un óptimo entre 4 y 7 para todas las fuentes nitrogenadas evaluadas. Estos valores de pH entre 3,5 y 10, también han sido reportado en *Lemna minor* en condiciones naturales (12) y entre 5 y 9 para todas las lemnáceas (13). Sin embargo, de acuerdo a cada fuente nitrogenada se encontraron valores de crecimiento diferentes, según el pH y con diferencia significativa ($P < 0,05$). Es decir, cuando *Lemna* sp. fue cultivada con urea se produjo el

crecimiento más elevado a pH 4 con un valor promedio de $1668,5 \pm 28,99$ frondes y con un descenso a pH inferiores o superiores a pH 4 (figura 1). De igual manera, este resultado se obtuvo para las demás fuentes nitrogenadas. El pH óptimo para amonio y nitrato de amonio fueron de 5 y 4 con valores de $182,5 \pm 44,55$ y $506 \pm 19,80$ frondes respectivamente (figuras 2 y 3). En cambio, el pH óptimo con nitrato de sodio se estableció a pH 7, pero sin diferencia significativa con respecto a pH 6 (figura 4).

Estos resultados indican también, que el mayor crecimiento de *Lemna* se obtuvo con urea a pH 4 con diferencia significativa ($P < 0,05$) y cuyo valor máximo fue de 3,3; 5,0 y 9,1 veces al encontrado con nitrato de

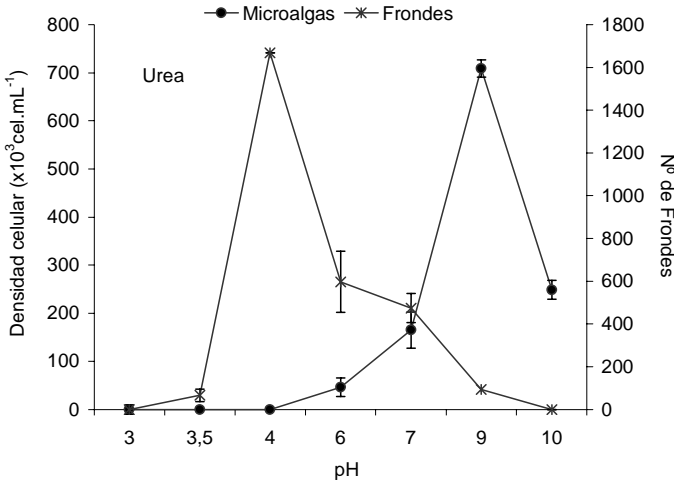


Figura 1. Efecto del pH sobre el crecimiento de *Lemna* sp. (número de frondes) y de microalgas (x10³ cel. mL⁻¹) con urea.

amonio, nitrato y amonio, respectivamente. De igual manera, con urea se produjo el peso seco más elevado de 0,636±0,69 mg.fronde⁻¹ con diferencia significativa (P<0,05) en relación a las demás fuentes nitrogenadas y para la cual también se logró disminuir el tiempo de duplicación de frondes a 3,82 días (cuadro 1). Estos resultados sugieren que, *Lemna* parece utilizar más eficientemente las fuentes nitrogenadas en el siguiente orden: urea> nitrato de amonio> amonio> nitrato, al menos a pH entre 4 y 7.

El elevado crecimiento de *Lemna* obtenido con urea sugiere la presencia activa de la enzima ureasa dependiente del pH y cuya actividad hace accesible dos moléculas de N-NH₄ para ser incorporadas directamente al metabolismo a través de la glutamina sintetasa (25).

Por otro lado, se destaca también

que cuando *Lemna* es mantenida a 3,5< pH ≤ 9 se induce un descenso del número de frondes hasta producir mortalidad en las plantas. Por ejemplo, a pH 9, el crecimiento descendió hasta un 40,0; 25,8; 16,0 y 5,5% en relación a los obtenidos al pH óptimo de 5, 7, 4 y 4 con amonio, nitrato, nitrato de amonio y urea respectivamente. En cambio, a pH 10 se incrementó el efecto letal con el tiempo de exposición para todas las fuentes nitrogenadas. Al término de 15 días se produjo la mortalidad del 100% de las plantas cuando fueron cultivadas con amonio y nitrato de amonio; mientras que a los 20 días se obtuvo con nitrato y urea (figura 5). Elevados pH también producen precipitación de sales de fosfato, hierro, manganeso, zinc y cobre, con lo cual hace menos disponibles estos nutrientes para el crecimiento de la planta (21).

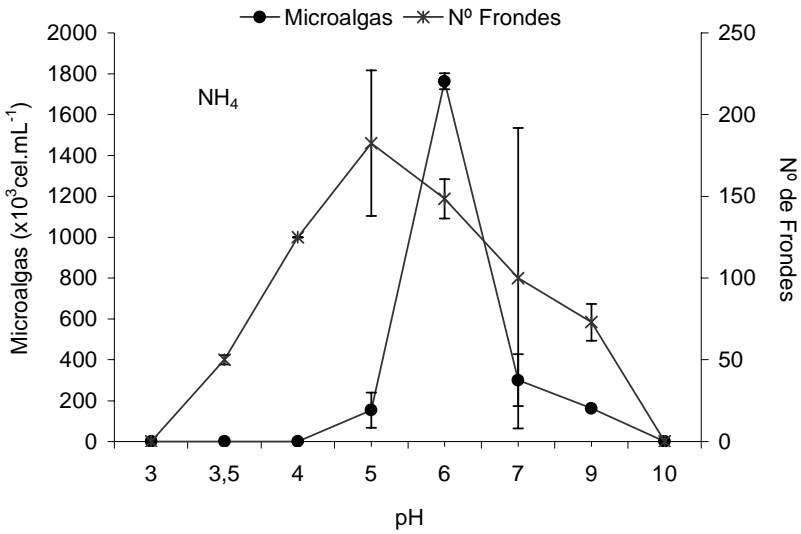


Figura 2. Efecto del pH sobre el crecimiento de *Lemna* sp y de microalgas cloruro de amonio.

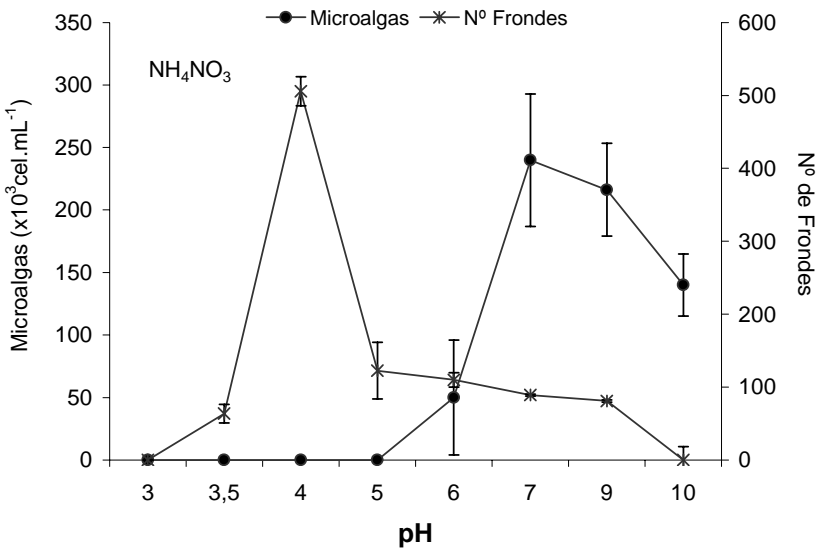


Figura 3. Efecto del pH sobre el crecimiento de *Lemna* sp. (número de frondes) y de microalgas (x10³ cel.mL⁻¹) con nitrato de amonio.

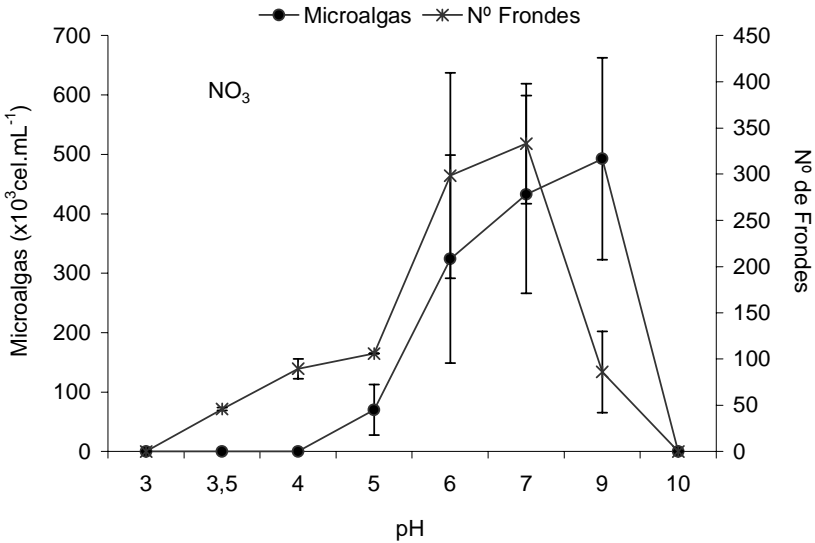


Figura 4. Efecto del pH sobre el crecimiento de *Lemna sp* (número de frondes) y de microalgas (x10³ cel. mL⁻¹) con nitrato de sodio.

El efecto tóxico del NH₃⁺ a pH>9 ha sido descrito en cultivos de *Lemna gibba* cuando se estudió la variación del pH entre 6,8 y 9,8 sobre la relación NH₄⁺/ NH₃⁺ (11). Así mismo, se ha observado mortalidad total de los frondes de *Lemna obscura* cultivada con amonio a pH>7, debido a la libe-

ración de iones NH₃⁺ a valores superiores a 100mg NH₃ L⁻¹ (13). No obstante, el efecto más drástico se detectó a pH entre 2 y 3, debido a que se produjo la mortalidad total de las colonias a las 24 horas de iniciado el experimento.

Cuadro 1. Peso fresco (mg.fronde⁻¹), tiempo de duplicación, número de frondes al inicio y final del experimento de *Lemna sp* alcanzado a cada pH óptimo en función de la fuente nitrogenada.

Fuente nitrogenada	pH óptimo*	Peso fresco (mg.fronde ⁻¹)	Td (días)	Nº frondes (inicial)	Nº de frondes* (final)
Amonio	5	0,186±0,077	11,36	57 ±4	182,50±44,55
Nitrato	7	0,298±0,012	7,45	59 ±6	333,00±65,05
Nitrato de amonio	4	0,435±0,094	6,79	41 ±3	506,00±19,80
Urea	4	0,636±0,690	3,82	43 ±2	1668,50±28,99

Nº de frondes*: valores alcanzados al pH óptimo.

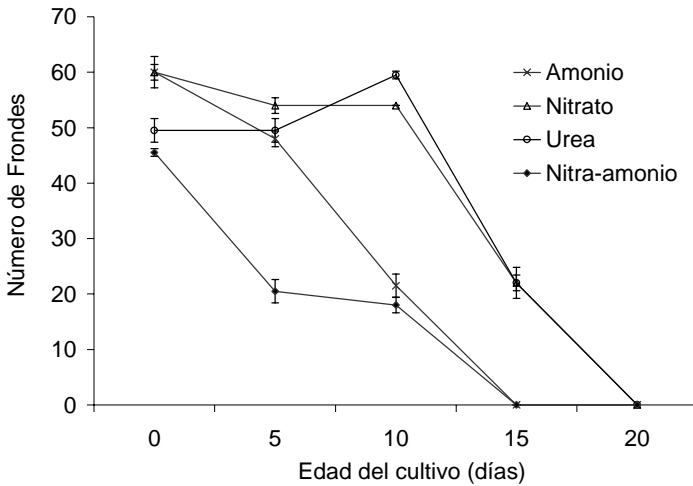


Figura 5. Efecto del pH 10 sobre la disminución del número de frondes de *Lemna* sp con diferentes fuentes nitrogenadas.

Crecimiento de microalgas asociadas al cultivo de *Lemna* en relación al pH y fuente nitrogenada

En los cultivos con *Lemna* mantenidos con las diferentes fuentes nitrogenadas se produjo un crecimiento significativo de microalgas a pH entre 6 y 9 (figuras 1, 2, 3 y 4). Los máximos valores de estos microorganismos variaron según el pH, fuente nitrogenada y grupo taxonómico. Es decir, con amonio y nitrato a pH 5, se produjo un predominio del 100% de diatomeas (cuadro 2). En cambio, con urea, nitrato de amonio y nitrato de sodio, las cianobacterias lograron dominar el 100% de la población total a pH 9; con un peso seco de $0,517 \pm 0,078$, $0,423 \pm 0,067$ y $0,800 \pm 0,047$ mg.ml⁻¹ respectivamente (cuadro 3). En presencia de nitrato de amonio, las cianobacterias también predominaron

con un 92,3 y 100% a pH 7 y 9 respectivamente (cuadro 2).

El elevado crecimiento de las diatomeas a pH 5 y 6 parece indicar que tanto el amonio como el nitrato parece estar más disponible a estos pH; al igual que el CO₂ a pH ≤ 6. Diversos estudios han demostrado que la solubilidad del CO₂ es incrementada a bajo pH (4); por lo que se hace más disponible para el crecimiento de estas microalgas. En cambio, a elevados pH alcanzan un mayor crecimiento las cianobacterias; con lo cual se sugiere la preferencia de HCO₃⁻ y CO₃²⁻ sobre el CO₂ independientemente de la fuente nitrogenada. Sin embargo, las cianobacterias también tienen la estrategia de usar el CO₂ en la interfase aire-agua cuando el pH ambiental es aumentado en aguas estratificadas térmicamente como las del lago de Maracaibo (19). Esto significa que, las cianobacterias lucen más competi-

Cuadro 2. Relación porcentual (%) de cianobacterias, clorofitas y diatomeas presentes en los cultivos de *Lemna* a diferentes pH y Fuentes nitrogenadas.

pH	Urea		NH ₄ NO ₃		NH ₄		NO ₃		
	Cian.	Clor.	Diat.	Cian.	Clor.	Diat.	Cian.	Clor.	Diat.
5	86,4	13,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100
6	56	ND	44	62,5	37,5	ND	ND	32,7	67,3
7	87	ND	13	92,3	ND	7,7	60,9	ND	100
9	99	ND	1	100	ND	ND	49,2	100	ND
10	85,76	ND	12,2	54,5	24,2	30,3	ND	ND	ND

Cian.: cianobacterias o cianofitas. Clor.: clorofitas. Diat.: diatomeas. ND: crecimiento no detectado.

vas que las microalgas a valores de pH ≥ 9 en función de la disponibilidad del carbono inorgánico.

El crecimiento satisfactorio de las microalgas y cianobacterias asociadas a *Lemna* en presencia de agua del lago a 4‰ soporta la hipótesis sobre la adaptación de estos microorganismos ante el incremento progresivo de la salinidad del lago desde la apertura del canal de navegación (19).

Es de indicar que el crecimiento de las microalgas está asociado al uso de agua del lago filtrada enriquecida con nutrientes, y al hecho de que las colonias de *Lemna* con microalgas asociadas a sus raíces, no cubrían todo el espejo de agua de las unidades de cultivo, por lo que la intensidad luminosa ejerció un papel importante para estimular su crecimiento. El crecimiento de microalgas aún con agua del lago autoclavada en las mismas condiciones de cultivo demuestra que su presencia obedece en parte a su asociación con las plantas de *Lemna* (resultados no presentados).

Estos resultados también sugieren que las microalgas son más competitivas que *Lemna* por la utilización de los nutrientes a valores de pH > 7. Szabó *et al.* (22), reportaron que las microalgas logran alcalinizar y remover a una mayor velocidad el hierro, fósforo y nitrógeno del medio, por lo que disminuyen los nutrientes para el crecimiento de *Lemna gibba* (22, 23, 24) Los resultados también demuestran que las microalgas aun pueden mantener su crecimiento a pH 10 con nitrato de amonio y urea, en relación a *Lemna*, que no logró sobrevivir a

Cuadro 3. Valores de peso seco ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de microalgas a pH 9 -10 y de hongos a pH 3,5 en cultivos de *Lemna*.

Fuente nitrogenada	Microalgas*					
	pH 9			pH 10		
	Hongos pH 3,5	Peso seco	Densidad celular ($\times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Peso seco	Densidad celular ($\times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Densidad celular ($\times 10^3 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Amonio	19,00 \pm 0,80	0,320 \pm 0,040	162,50 \pm 3,54	ND	ND	ND
Nitrato	19,30 \pm 2,10	0,800 \pm 0,047	492,50 \pm 169,71	ND	ND	ND
Nitrato de amonio	15,95 \pm 5,30	0,423 \pm 0,067	216,25 \pm 37,12	0,820 \pm 0,127	140,00 \pm 24,75	140,00 \pm 24,75
Urea	18,85 \pm 4,03	0,517 \pm 0,078	708,75 \pm 19,45	1,358 \pm 0,035	248,75 \pm 44,20	248,75 \pm 44,20

*Microalgas (cianobacterias o cianofitas, clorofitas y diatomeas). ND: crecimiento no detectado.

este pH (cuadro 3).

Crecimiento de hongos asociados a los cultivos de *Lemna* sp.

En todos los cultivos a pH comprendidos entre 3,5 y 6 se observó el crecimiento de hongos, con micelio septado y productor de estructuras con características de esporangios. El mayor crecimiento detectado a pH 3,5 nos permitió evaluar el peso seco de la biomasa colectada con valores comprendidos entre $15,95 \pm 5,30$ y $19,30 \pm 2,10$ mg.ml⁻¹ en los cultivos con nitrato de amonio y nitrato respecti-

vamente (cuadro 3).

De acuerdo a las observaciones realizadas pudieran estar presentes dos cepas de hongos, uno de los cuales inicia su crecimiento en la raíz de *Lemna* hasta invadir todos los frondes y causar luego la muerte de la colonia. Es posible, que el crecimiento de estos hongos sea favorecido con el agua del lago filtrada enriquecida con nutrientes; sin embargo también se observó su presencia con agua del lago previamente autoclavada y en el mismo rango de pH.

Conclusiones

La macrófita *Lemna* sp es capaz de mantener su crecimiento en un amplio rango de pH entre 3,5 y 9,0 en condiciones de laboratorio; aunque acusa alta sensibilidad cuando es expuesta a pH extremos. Es decir, a pH<3,5 se produjo mortalidad del 100% a las 24h de exposición; mientras que a pH>9 el efecto nocivo alcanzó su máximo a los 15 días en presencia de amonio y a los 20 días con urea, nitrato de sodio y nitrato de amonio.

El pH óptimo de crecimiento depende de la fuente nitrogenada y estuvo en el siguiente orden: urea, pH 4 > nitrato de amonio, pH 4 > nitrato de sodio, pH 6-7 > amonio, pH 5-6 y

con valores promedios de $1668,5 \pm 28,99$; $506 \pm 19,80$; $333 \pm 65,05$ y de $182,5 \pm 44,55$ frondes verdes respectivamente.

La macrófita *Lemna* resulto ser más competitiva que las microalgas y cianobacterias cuando es cultivada a un pH entre 4 y 7. Es decir, a este intervalo de pH el crecimiento de *Lemna* es estimulado; mientras que a pH \geq 9 se alcanza el crecimiento óptimo para las cianobacterias. Por otra parte, *Lemna* presentó sensibilidad al efecto de hongos fitopatógenos a pH<6. Estos resultados sugieren que el pH y la fuente nitrogenada constituyen reguladores esenciales del crecimiento de *Lemna*.

Recomendaciones

Es recomendable continuar con estudios sobre la influencia de fuentes nitrogenadas y del pH tomando en cuenta las variables adicionales de peso seco, clorofila total, carotenoides

y crecimiento de las raíces a fin de integrar aun más la respuesta de *Lemna* en función del nitrógeno y del pH.

En virtud de que el crecimiento excesivo de *Lemna* pudiera ser con-

trolado con la aplicación de compuestos de naturaleza ácida a valores de pH <3,5, se proponen estudios con ácidos débiles como el vinagre a escala de laboratorio y a cielo abierto. Así-

mismo, es de sumo interés el estudio de los hongos fitopatógenos de *Lemna* como posibles controles biológicos en condiciones de laboratorio.

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación ha sido cofinanciado por el Proyecto ICLAM P0402-5 y con suministros y equipos adquiridos por el Proyecto FONACIT S-1 2000000786.

Agradecemos a Ender Villalba y Willians Maldonado, personal técnico del ICLAM por su cooperación en los experimentos y apoyo logístico.

Literatura citada

1. Alaerts, G., M. Mahbubar y P. Kelderman. 1996. Performance analysis of a full-scale duckweed-covered sewage lagoon. *Water Res.* 30: 843-852.
2. Al-Nozaily, F., G. Alaerts y S. Veenstra. 2000. Performance of duckweed-covered sewage lagoons-II-Nitrogen and phosphorus balance and plant productivity. *Water Res.* 34: 2734-2741.
3. Bermúdez, J., N. Rosales, C. Loreto, B. Briceño y E. Morales. 2003. Exopolysaccharides, pigments and protein production of marine microalga *Chroomonas* sp. in semicontinuous cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 179-183.
4. Borowitzka, M. y L. Borowitzka. 1998. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press. New York.
5. Cedergreen, N. y R. Vindbaek. 2002. Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*. *New Phytol.*, 155: 285-292.
6. Clement, B. y G. Merlin . 1995. The contribution of ammonia and alkalinity to landfill leachate toxicity to duckweed. *Sci. Total Environ.* 170: 71-79.
7. Eberius, M. 2001. Observation parameters of the duckweed growth inhibition test: frond number-total frond area-dry weight. *Lemna Tech.* 14: 1-2.
8. Environmental Pollution Agency (EPA). 1996. Ecological effects test guidelines-1996. OPPTS 850.4400. Aquatic plant toxicity: Test using *Lemna* sp. United States Environmental Pollution Agency. pp. 8.
9. Herrera, L. 2004. Informe de la comisión especial de La Universidad del Zulia, Venezuela, designada para el estudio de afloramiento masivo de *Lemna* sp. en el Lago de Maracaibo. 8 pp.
10. Janse, J. y P. Van Puijenbroek. 1998. *Environ. Pollution*, 102: 547-552.
11. Körner, S., S. Das, J. Vermaat, J. y S. Veenstra. 2001. The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. *Aquatic Botany* 71: 71-78.
12. Landolt, E. y R. Kandeler. 1987. Biosystematics investigation in the family of duckweeds (Lemnaceae). The family of the Lemnaceae: a monographic study. Vol. 2. Veroff. Geobot. Inst. ETH, Zurich.

13. Leng, R., J. Stambolic y R. Bell. 1995. Duckweed- a pontential high-protein feed resource for domestic animals and fish. *Livestock Res. Rural Development*, 7: 1-11.
14. McClay, C. 1976. The effect on pH on the population growth of three species of duckweed: *Spirodela oligorrhiza*, *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza*. *Freshwater Biology*, 6: 125-136.
15. Mehra, A., M. Farago, D. Banerjee, D. y K. Cordes. 1999. The water hyacinth: an environmental friend or pest? A review. *Res. Environ. Biotechnol.*, 2: 255-281.
16. Morales, E., M. Rodríguez, D. García, C. Loreto y E. Marco. 2002. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. *Interciencia*, 27: 373-378.
17. Portielje, R. y M. Roijackers. 1995. Primary sucesion of aquactic macrophytes in experimental ditches in relation to nutrient input. *Aquatic Botany*. 50: 127-140.
18. Rejmankova, E., M. Rejmanek y J. Kvet. 1990. Maximizing duckweed production by suitable harvest strategy. pp. 39-43. En: D. Whigham, R. Good y J. Kvet (Eds.). *Wetland Ecology and Management: Case studies*. Kluwer Publisher, Países Bajos.
19. Rodríguez, G. 2001. El Lago de Maracaibo como cuenca anaeróbica natural: Uso de líneas de base históricas en estudios de impacto ambiental. *Interciencia*, 26: 450-456.
20. Rubio, G., Zhu, J. y J. Lynch. 2003. A critical test of the two prevailing theories of plant response to nutrient availability. *Am. J. Botany*. 90: 143-152.
21. Skillicorn, P., W. Spira y W. Journey. 1993. Duckweed Aquaculture. A new aquatic farming system for developing countries. The World Bank Washington, D.C. pp 1-75.
22. Szabó, S., M. Braun, S. Balázs y O. Reisinger. 1998. Influences of nine algal species isolated from duckweed-covered sewage miniponds on *Lemna gibba*. *Aquatic Botany*, 60: 189-195.
23. Szabó, S., Braun, M. y G. Borics. 1999. Elemental flux between algae and duckweeds (*Lemna gibba*) during competition. *Arch. Hydrobiol.* 146: 355-367.
24. Szabó, S., R. Roijackers y M. Scheffer. 2004. A simple method for analysing the effects of algae on the growth of *Lemna* and reverting algal growth in duckweed bioassays. *Archiv Für Hydrobiologie*. 157: 567-575.
25. Witte, C. y N. Medina-Escobar. 2001. In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Anal. Biochem.* 290: 102-107.
26. Zimmo, O., R. Al Saled y H. Gijzen. 2000. Comparison between algae-based and duckweed-based wastewater treatment: differences in environmental conditions and nitrogen transformations. *Water Sc. Tech.* 42: 215-222.