

Adaptación del método Acreman para la limpieza de plantas en *Lemna minuta* (Araceae: Lemnoideae)

Adaptation of the Acreman method for cleaning plants in *Lemna minuta* (Araceae: Lemnoideae)

Daniel Ferley Ramírez Babativa¹

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.53219

RESUMEN

Lemna minuta es una macrófita flotante de amplia distribución en ecosistemas lénticos, que puede ser útil en el desarrollo de experimentos ecofisiológicos y ecotoxicológicos debido a su potencial sensibilidad a contaminantes acuáticos como toxinas y metales pesados. Para estos, inicialmente se deben establecer cultivos axénicos con sus poblaciones bajo condiciones de laboratorio, los cuales requieren técnicas de limpieza para sus frondas que aún no han sido definidas. Se adaptó el método de Acreman en su tiempo de exposición y concentración de hipoclorito de sodio, propuesto para la desinfección de las especies pertenecientes al género *Lemna* L. (Lemnoideae) a partir de colonias nativas. Las colonias se obtuvieron de un humedal de la ciudad de Bogotá, y posteriormente se aclimataron y desinfectaron en diferentes tiempos y soluciones de hipoclorito. Los resultados más adecuados para la remoción de algas epífitas y otros microorganismos de las frondas, sin presentar alta mortalidad de las colonias, se obtuvieron, respectivamente, en las concentraciones 0,5 % (45 y 30 segundos) y 0,25 % (60 segundos) de hipoclorito. Por el contrario, el tiempo de exposición de 60 segundos propuesto por el método Acreman (0,5%) resultó en la mortalidad total de las frondas (100 %). Se sugiere utilizar una solución de hipoclorito de sodio 0,5% en un tiempo de exposición menor o igual a 45 segundos para la desinfección de colonias de *L. minuta* con fines experimentales.

Palabras clave: contaminación, fronda, hipoclorito, *Lemna minuta*, medio de cultivo.

ABSTRACT

Lemna minuta is a floating macrophyte widely distributed in lentic ecosystems, which may be useful for development of ecophysiological and ecotoxicological experiments, due to its sensitivity to water pollutants such as toxins and heavy metals. Axenic cultures and cleaning techniques of fronds from their populations under laboratory conditions have not yet been defined. Acreman method was modified in exposure time and concentration of sodium hypochlorite for disinfection from native colonies of species belong to genus *Lemna* L. (Lemnoideae). The colonies were obtained from an urban wetland of Bogota city, and they were acclimatized and disinfected at different times with hypochlorite solutions. The most suitable results for the removal of epiphytic algae and other microorganisms of the fronds, without showing high mortality of colonies, were obtained, respectively, in 0,5 % (45 and 30 seconds) and 0,25 % (60 seconds) hypochlorite concentrations. By contrast, the exposure time of 60 seconds proposed by Acreman method (0,5 %) resulted in total mortality of fronds (100 %). This report suggests use a solution of 0,5 % sodium hypochlorite in an exposure time of 45 seconds or less for disinfect colonies of *L. minuta* with experimental purposes.

Key words: contamination, frond, hypochlorite, *Lemna minuta*, culture media.

Recibido: mayo 24 de 2018 **Aprobado:** mayo 3 de 2019

¹ Biólogo - Estudiante de Maestría en Ciencias. Instituto de Ecología, A.C. INECOL, Xalapa-Enríquez, Ver., México. <http://orcid.org/0000-0002-4340-9960>. danielferley@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las especies de la subfamilia Lemnoideae (Araceae), conocidas también como lentejas de agua, son las plantas vasculares acuáticas más simples y diminutas a nivel estructural y reproductivo en el mundo (Cross, 2002). Se reconocen 37 especies y cinco géneros: *Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* y *Wolffia* (Stevens, 2001). Estas macrófitas flotantes de distribución cosmopolita se presentan principalmente en los sistemas acuáticos lénticos, y se caracterizan por un rápido crecimiento de sus frondas (o talos) de forma vegetativa, llegando a cubrir gran parte de los espejos de agua (Armstrong, 2011). *Lemna minuta* Kunth es una pequeña macrófita conformada por una o varias frondas (2-6) que forman una colonia. La fronda es una estructura compleja que representa al tallo y la hoja, que presenta una corta vena (o ausencia) y una sola raíz (Landolt, 1986). La floración de *L. minuta* es muy rara, al igual que la mayoría de las lentejas de agua, aunque esta puede ocurrir frente a cambios abruptos en diferentes condiciones ambientales, como fotoperíodos de 12 a 16 horas de luz y temperaturas de 22°C a 32°C (Landolt & Kandeler, 1987).

A causa de su amplia distribución mundial en ecosistemas lénticos, varias especies del género *Lemna* L., especialmente *Lemna minor*, han sido usadas a nivel experimental ecológico y toxicológico por su alta sensibilidad frente a las concentraciones de nutrientes en el agua y su rápida respuesta fisiológica a la presencia de sustancias o materiales que pueden ser dañinos para su crecimiento (Hillman, 1961; Wang, 1990; Wang & Freemark, 1995). Debido a esto, dentro del área ecotoxicológica, se han desarrollado diversos protocolos para evaluar, monitorear y determinar la calidad de agua mediante especies del género *Lemna*, por entidades internacionales como: el Instituto Sueco de Investigación Aplicada del Medio Ambiente (ITM, 1990), el Instituto Sueco de Normalización (SIS, 1995), la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 1996), la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR, 1996), la Organización Internacional de Normalización (ISO, 2005), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD, 2006), el Ministerio del Medio Ambiente de Canadá (EC, 2007), y la Asociación Americana de Salud Pública (APHA *et al.*, 2011).

L. minuta puede ser una potencial macrófita nativa para la realización de bioensayos, biomonitoreos y fitorremediación, así como para otros estudios ecotoxicológicos, fisiológicos y bioquímicos (Caris *et al.*, 2006; Ramírez, 2011; Van Echelpoel *et al.*, 2016). Su pequeño tamaño, rápido crecimiento y su fácil mantenimiento en condiciones de laboratorio, podrían posibilitar la formación de un cultivo axénico a partir de individuos colectados en campo, con miras a desarrollar investigaciones experimentales. Por otra parte, para iniciar un cultivo de cualquier especie de *Lemna*, una de las principales referencias para la esterilización de las frondas en los últi-

mos años ha sido el método propuesto por la Dra. Judy Acreman (2007), donde se describe paso a paso los requerimientos para la obtención de un cultivo axénico. Este método puede presentar altos índices de mortalidad en las frondas durante su ejecución, debido al tiempo de exposición (60 s) y la sensibilidad al desinfectante (solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %).

El uso experimental de *L. minuta* ha sido reportado en el país por Valderrama *et al.*, (2002), Gómez (2002) y Ramírez (2011) para tratamientos de sistemas de aguas residuales o como propuesta para bioensayos de ecotoxicidad acuática; sin embargo, debido al enfoque de estos estudios, no se describen detalles sobre un método de limpieza de frondas de esta macrófita en Colombia. La distribución de las frondas de *L. minuta* ha sido reportada en lagunas y humedales de la región andina, entre los 1800 hasta los 3300 msnm, principalmente en temporada de secas, debido a su abundancia en el espejo de agua (Schmidt-Munn, 1998). Por otra parte, el estado de eutrofización del cuerpo de agua puede aumentar la presencia de organismos en las frondas, lo que dificulta la selección de ambientes acuáticos y de frondas menos contaminadas para la aplicación de técnicas de limpieza. El objetivo de este trabajo es establecer el proceso de desinfección adecuado para las frondas de *L. minuta*, mediante modificación del método de limpieza propuesto por J. Acreman, y así promover la formación y desarrollo de cultivos axénicos para aplicaciones experimentales en laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de fronda madre

Las colonias de *Lemna minuta* fueron colectadas en el humedal de Santa María del Lago en Bogotá D.C., a partir de la revisión de las plantas acuáticas en la sabana de Bogotá de Schmidt-Mumm (1998). La macrófita se identificó mediante la clave taxonómica de Landolt y Schmidt-Mumm (2009). Para formar el cultivo base o *stock* de limpieza, todas las plantas deben provenir de una única fronda o clon, conocida como fronda madre (Landolt, 1986). Para esto, se seleccionó una fronda sin clorosis, necrosis, y con baja presencia de algas y cianofíceas en talo y raíz (evidente a simple vista). Las colonias de la fronda madre, conformadas generalmente por dos a cuatro individuos, se mantuvieron durante dos meses en vasos de precipitado de 2 L con 1,5 L de agua del humedal para su aclimatación, con una renovación semanal del agua sin ningún tratamiento (EC, 2007).

Tratamientos para limpieza de frondas

El método Acreman (2007) consiste en la obtención de un cultivo axénico mediante la esterilización de las plantas de *Lemna* usando hipoclorito de sodio al 0,5 % (Clorox® 10%), con exposiciones repetidas durante más de un minuto, para asegurar la eliminación de agentes contaminantes como bacterias y hongos (tabla 1). Para aplicar este método de limpieza, se dispuso inicialmente de 100 frondas, ya que cerca del 1-

Tabla 1. Descripción de las ventajas y desventajas del método Acreman (2007) de limpieza de frondas en *Lemna*.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
1. Es altamente eficiente para retirar contaminantes orgánicos e inorgánicos en las frondas y obtener un cultivo axénico.	1. Requiere de un amplio cultivo stock para iniciar la limpieza de frondas (> 500 individuos).
2. Permite el tratamiento en una amplia gama de especies de <i>Lemna</i> e incluso en otros géneros de la familia Lemnoideae.	2. La tasa de supervivencia de frondas es muy baja (1-10%) lo que promueve una alta pérdida de material vegetal.
3. Es versátil en los tiempos de exposición de frondas durante su limpieza facilitando la manipulación para el experimentador.	3. Requiere áreas amplias en laboratorio y con condiciones ambientales específicas para el mantenimiento de frondas.
4. Facilita su aplicación en laboratorio por el uso de descontaminantes de uso común (hipoclorito).	4. Aumenta los tiempos de obtención de resultados por su alta tasa de mortalidad (ca. 100%)

Tabla 2. Resumen del análisis de varianza (ANDEVA) de las variables medidas en la desinfección de *L. minuta* (n=36) respecto al porcentaje de supervivencia de las frondas. Los tratamientos de concentración de hipoclorito y tiempo de exposición presentan diferencias significativas ($p > F$).

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p (>F)
Concentración de NaClO	1	27309,7	27309,7	178,1	<0,01
Tiempo de exposición	1	1432,4	1432,4	9,3	<0,01
Interacción	1	904,8	904,8	5,9	<0,05
Error	32	4908,6	153,4		
TOTAL	35	34555,5			

10 % sobrevive la desinfección. Cuando el cultivo stock alcanzó un aproximado de 400 frondas (ca. dos meses), se aplicó a 10 frondas tres tratamientos con dosis de 0,125 %, 0,25 % y 0,5 % de hipoclorito de sodio (Clorox® 4,5 %). Se realizaron tres réplicas, separando las frondas de sus colonias con pinzas entomológicas y sumergiéndolas en cada tratamiento durante 15 s, 30 s, 45 s y 60 s por separado. Posteriormente se lavaron en agua destilada, y cada grupo se traspasó al medio de cultivo sin nutrientes orgánicos (APHA) para su seguimiento (EC, 2007). Transcurridas 48 h, se contaron los individuos que presentaban coloración verde en el cen-

tro de la fronda para calcular la supervivencia a cada tratamiento. Asimismo, para comprobar la efectividad del método, se revisó la presencia/ausencia de algas y cianofíceas en los talos en cada tratamiento utilizando un aumento de 400x bajo microscopio óptico Nikon® (modelo Eclipse E200). Todas las manipulaciones y transferencias de las frondas se realizaron en un ambiente aséptico generado por una cámara de flujo laminar.

Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de varianza de dos factores (ANDEVA) para analizar del porcentaje de superviven-

cia entre los tiempos de exposición de las frondas y el nivel de concentración de hipoclorito, seguido de una prueba *post hoc* de Tukey para comparar los tratamientos. Un valor de $p < 0,05$ fue utilizado como criterio para considerar diferencias significativas. Los análisis se desarrollaron con el software RStudio (2015, versión 0.98.501).

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Para la obtención de un cultivo axénico de *L. minuta* es indispensable adecuar un método de limpieza para sus frondas que sirva como referencia para cualquier uso experimental o en la utilización de cultivos con fines de investigación bajo condiciones controladas de laboratorio (Ramírez-Babatava & Espinosa-Ramírez, 2018).

Efecto del hipoclorito sobre las frondas de *L. minuta*

El porcentaje de supervivencia de frondas de *L. minuta* presentó diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes tiempos de exposición y concentraciones de hipoclorito (tabla 2). Los mayores valores de supervivencia se presentaron en las frondas limpiadas con hipoclorito al 0,125 % durante 15 s y 45 s, con 83 % cada uno, mientras los menores valores (< 3 %) se presentaron con hipoclorito al 0,5 % durante 45 s y 60 s (figura 1). No se presentó supervivencia de frondas en el tratamiento con 0,5 % de hipoclorito durante 60 s. En general, se observó una tendencia con mayor supervivencia en las frondas limpiadas con hipoclorito al 0,125 %, mientras las

frondas con menor supervivencia se presentaron en el tratamiento con hipoclorito al 0,5 %.

Por otra parte, se evidenció la presencia de algas o cianofíceas en fronda y raíz posterior a la limpieza en todos los tratamientos con hipoclorito al 0,125 % y 0,25 %, a excepción del tratamiento a 60 s. A su vez, en los tratamientos con hipoclorito al 0,5 % se registró la presencia de estos microorganismos durante el tiempo de exposición de 15 s. Asimismo, la alta mortalidad de frondas en hipoclorito 0,5 % durante 60 s y 45 s, sugieren que esta concentración es muy alta para la limpieza de la planta, por lo cual deben utilizarse tiempos o concentraciones menores a las recomendadas por el método Acreman.

Para la obtención de un monocultivo de *L. minuta*, sin presencia de algas u otros microorganismos en fronda y raíz, estos resultados sugieren que podría utilizarse hipoclorito de sodio en concentraciones menores al 0,5 % y con tiempo de exposición menor a 60 s, valores menores a los recomendados por el método Acreman (2007). Adicionalmente, se propone repetir este proceso de limpieza cada cuatro meses en el cultivo axénico, para evitar una propagación de algas resistentes a la limpieza por hipoclorito o una contaminación de frondas por una manipulación experimental inadecuada. Independiente del uso experimental de *Lemna*, la limpieza de las frondas de manera temporal permitiría disponer de un cultivo *stock* de crecimiento conti-

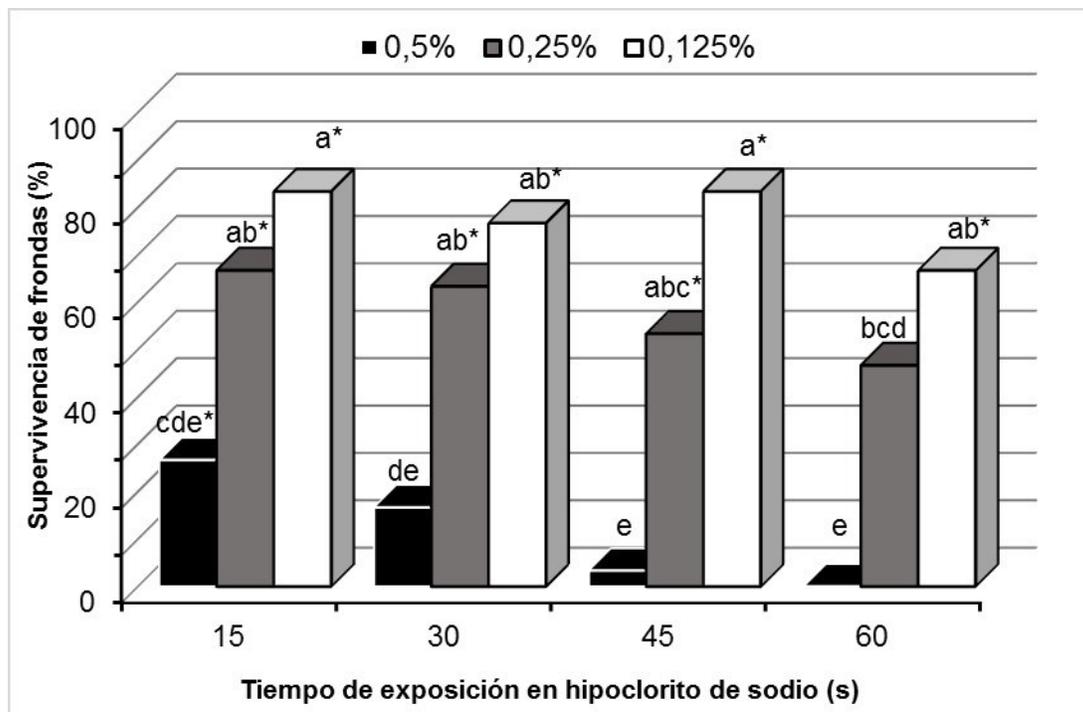


Figura 1. Efecto de la limpieza de hipoclorito de sodio a concentraciones 0,125%, 0,25% y 0,5% con diferentes tiempos de exposición sobre el porcentaje de supervivencia de frondas de *L. minuta*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. (*) Indica presencia de algas en fronda o raíz posterior al tratamiento.

nuo en laboratorio. Finalmente, se recomienda modificar el método de desinfección de frondas de Acreman para obtener un cultivo axénico de cualquier otra especie del género *Lemna*, ya que estas pueden requerir diferentes concentraciones y tiempos de exposición para desinfectar sus frondas.

CONCLUSIONES

La modificación del método de limpieza de Acreman para *L. minuta* fue efectiva en la obtención de un monocultivo axénico a partir de una planta nativa de humedal urbano. La descontaminación fue posible en hipoclorito 0,5 % durante 45 y 30 segundos, o en concentración de hipoclorito 0,25 % a 60 segundos, debido a la baja mortalidad de las frondas y la alta efectividad en la remoción de algas y otros microorganismos.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece el apoyo, guía y orientación de A. Espinosa-Ramírez (Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia), los textos de Lemnáceas compartidos por el Dr. Elias Landolt (Q.E.P.D.), y el espacio brindado para el desarrollo de los experimentos al Laboratorio de Ingeniería Ambiental (Universidad Nacional de Colombia).

REFERENCIAS

- 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. Environmental Protection Publications, pp. 102-108.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF). (2011). Duckweed, part 8211, En: *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. USA.
- Armstrong W. (2011). Wayne's Word Lemnaceae: 21 September 2013. URL: <http://waynesword.palomar.edu/1wayindx.htm> (accessed 23 September 2015).
- Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). Determination of the inhibitory effect on the growth of *Lemna minor*. XP T 90-337. Paris La Défense Cedex, France, 10 p.
- Caris, M., Andrade, A. y Philippi, L. (2008). Determinação do potencial de biorremediação de nutrientes e bioindicação de águas residuárias da suinocultura por macrófitas flutuantes (*Lemna minuta*)—Efeito de altas taxas de nitrogênio amoniacal. *Evidência-Ciência e Biotecnologia*, 8(1-2), 85-102.
- Cross, J. (2002). The charms of duckweed: 14 March 2014. URL: <http://www.mobot.org/jwccross/duckweed/duckweed-charms.htm> (accessed 23 September 2015).
- 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.
- Gómez, M. (2002). Evaluación del efecto de la población de *Lemna minuta* en la estructura y dinámica de la comunidad bacteriana aerobia heterótrofa presente en un sistema de lagunaje para el tratamiento de aguas residuales. Tesis de pregrado en Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Hillman, W. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: a review of the descriptive and experimental literature. *The Botanical Review* 27, 221-287. DOI: 10.1007/BF02860083.
- Institute of Applied Environmental Research (ITM). (1990). Method for toxicity test with the floating plant *Lemna minor*, duckweed. *ITM report 7*. Solna, Sweden.
- International Organization for Standardization (ISO). (2005). Water quality -Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test', Final draft ISO/DIS 20079. Geneva, Switzerland.
- Landolt, E. y Schmidt-Mumm, U. (2009). Lemnaceae. Flora de Colombia No. 24. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Colombia, 54 p.
- Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations on the family of duckweeds: The family of Lemnaceae-a monographic study. Vol. 1 (Heft 71). Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH). Stiftung Rübel, Zürich, Deutschland, 566 p.
- Landolt, E., & Kandeler, R. (1987). Biosystematic investigations on the family of duckweeds: The family of Lemnaceae- a monographic study. Vol. 2 (Heft 95). Geobotanischen Institutes der Eidgenössischen Technischen Hochschule (ETH). Stiftung Rübel, Zürich, Deutschland, 638 p.
- 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.
- Ramírez, D. (2011). Propuesta para el desarrollo de un protocolo de laboratorio para el cultivo de *Lemna minuta* (Araceae). Tesis de pregrado en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Ramírez-Babativa, D. y Espinosa-Ramírez, A. (2018). Comparación de las características poblacionales de *Lemna minuta* (ARACEAE: LEMNOIDEAE) en tres medios de cultivo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 84-96.
- RStudio Team. (2015). RStudio: Integrated development for R. RStudio, Inc., Boston, Massachusetts, USA. URL: <http://www.rstudio.com/>.
- Schmidt-Munn, U. (1998). Vegetación acuática y palustre de la sabana de Bogotá y plano del río Ubaté. Tesis de Maestría en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Stevens, P. (2001). Angiosperm Phylogeny Website: 12 July 2012. URL: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> (accessed 23 September 2015).
- Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality -Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, Duckweed. Svensk Standard SS 02 82 13. Stockholm, Sweden, 15 p.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). Aquatic plant toxicity test using *Lemna* spp. Tiers I and II "Public Draft", Ecological effects test guidelines OPPTS 850.4400, United States Environmental Protection Agency Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101) EPA 712-C-96-156. 5 p.
- Valderrama, L., Del Campo, C., Rodriguez, C., de-Bashan, L. & Bashan, Y. (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research* 36(17), 4185-4192. DOI: 10.1016/S0043-1354(02)00143-4.
- Van Echelpoel, W., Boets, P. & Goethals, P. (2016). Functional Response (FR) and Relative Growth Rate (RGR) Do Not Show the Known Invasiveness of *Lemna minuta* (Kunth). *PLoS ONE* 11(11), e0166132. DOI: 10.1371/journal.pone.0166132.
- Wang, W. (1990). Literature review of duckweed toxicity testing. *Environmental Research* 51, 7-22. DOI: 10.1007/BF02860083.
- Wang, W., & Freemark, K. (1995). The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30, 289-301. DOI: 10.1006/eesa.1995.1033.