



## **TÍTULO DEL TRABAJO**

“Capacidad de retención del nitrógeno por el macrófito *Chara hispida* procedente de una laguna de Ruidera”

## **TÍTULO RESUMIDO**

Retención de nitrógeno por *Chara hispida*

## **NOMBRE DE AUTORES**

María A. Rodrigo\*, Cira Caballero, Carmen Rojo y Miguel Álvarez<sup>1</sup>

## **NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LAS INSTITUCIONES**

Instituto Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva. Universitat de Valencia. Apartado Oficial 2085. 46071-Valencia.

<sup>1</sup>: Centro de Ciencias Medioambientales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid

## **NÚMERO DE TELÉFONO, FAX Y E-MAIL**

Tel: int+34963543596; Fax: int+34963543670; e-mail: maria.a.rodrigo@uv.es

## **FIGURAS Y TABLAS**

3 figuras y 1 tabla

## CAPACIDAD DE RETENCIÓN DEL NITRÓGENO POR EL MACRÓFITO *Chara hispida* PROCEDENTE DE UNA LAGUNA DE RUIDERA

María A. Rodrigo\*, Cira Caballero, Carmen Rojo y Miguel Álvarez<sup>1</sup>

Instituto Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva. Universitat de València

<sup>1</sup>: Centro de Ciencias Medioambientales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.  
Madrid

### RESUMEN

Se ha determinado mediante experimentos de laboratorio (asimilación de  $N^{15}$  y disminución de la concentración de nitrato) la tasa de incorporación de nitrógeno por parte del macrófito *Chara hispida* procedente de La Colgada, una de las 15 lagunas del Parque Natural de las lagunas de Ruidera (Castilla-La Mancha). Se siguió el crecimiento de ejemplares de *Chara* en acuarios experimentales desde la germinación hasta que contaban con una altura promedio de 15 cm, momento en el que se adicionó nitrato ( $N^{14}+N^{15}$ ). El primer método de incorporación de N dio un valor de 0.0165 mgN/gPS-h, mientras que la tasa de reducción estimada a partir de la disminución del nitrógeno en el agua fue de 0.1435 mgN/gPS-h. Esto supone que al menos un 11.5% del nitrógeno de la laguna queda retenido por los macrófitos. La tasa de incorporación de N por *Chara* en el laboratorio aplicada a la laguna implica que las praderas de carófitos de La Colgada pueden incorporar 2.67 Kg N/h.

**Palabras clave:** carófitos,  $N^{15}$ , incorporación, lagunas de Ruidera.

### CAPABILITY OF NITROGEN RETENTION BY THE MACROPHYTE *Chara hispida* FROM A RUIDERA LAKE (SPAIN)

#### ABSTRACT

Nitrate uptake rates in the submerged macrophyte *Chara hispida* were determined by  $^{15}N$  addition and by disappearance of nitrate from the water in laboratory experiments. The macrophyte spores came from Colgada Lake, one of the 15 lakes in Ruidera Natural Park (Castilla-La Mancha, Spain). We followed the growth of *Chara* individuals in experimental aquaria from germination until they had an average height of 15 cm, then nitrate ( $N^{14}+N^{15}$ ) was added. The first method of N uptake gives a value of 0.0165 mgN/gDW-h, whereas with the second the value was 0.1435 mgN/gDW-h. This implies that at least 11.5% of dissolved nitrogen is taken up by charophytes. Nitrogen uptake rates obtained through lab experiments has been transferred to the natural environment to calculate the incorporation of nitrogen by *Chara* beds in Colgada Lake, and it is of 2.67 Kg N/h.

**Key words:** charophytes,  $^{15}N$ , uptake, Ruidera lakes.

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de las aguas por nitratos es un problema muy extendido en Europa y en particular en España. Es especialmente serio en los entornos agrícolas por el consumo inmoderado de fertilizantes nitrogenados (Vitousek et al. 1997). El Parque Natural de las lagunas de Ruidera es un espacio natural muy característico de Castilla-La Mancha, y de gran importancia no solo en España sino en el contexto europeo. En los últimos años se ha detectado una tendencia de aumento de los niveles de fósforo y especialmente de nitrógeno en las aguas de estas lagunas (Álvarez-Cobelas et al. 2004). Las fuentes de contaminación detectadas han sido los efluentes de aguas residuales de los municipios vecinos, las filtraciones del agua residual de las fosas sépticas de viviendas, hoteles, restaurantes, campings y chalets ubicados en el entorno y los aportes de nitrato desde el acuífero, procedentes del abonado intensivo con compuestos nitrogenados en la zona de las lagunas altas (Álvarez-Cobelas et al. 2004).

En el marco de un proyecto de investigación que estudia de forma global los procesos lacustres implicados en la desnitrificación del agua proveniente de acuíferos (REN2002-00558 / HID) en las lagunas de Ruidera, se pretende evaluar la capacidad de retención del nitrato por las praderas de carófitos desarrolladas en una de dichas lagunas. Los macrófitos sumergidos han sido descritos en muchas ocasiones como importantes retenedores de

nutrientes (Jeppesen, 1998), su desarrollo consume e inmoviliza nutrientes en el sedimento, controlando así el crecimiento de las algas microscópicas y mejorando la calidad del agua. De las 15 lagunas que conforman el parque natural, la laguna Colgada fue la elegida para realizar los estudios, pues es la que presenta una mayor cobertura de carófitos, en razón de su extensión (Álvarez-Cobelas et al. 2004). Se trata de una laguna de 103 Ha de superficie que presenta una profundidad media de 8 m y una profundidad máxima de 18 m. La extensión de macrófitos sumergidos cubre una superficie de 39 Ha (valor promedio de los años 2003 y 2004; Álvarez Cobelas et al., datos no publicados), que representan 405 Ton de biomasa seca de macrófitos, con el carófito *Chara hispida* como la especie dominante (Cirujano, com. pers.).

En concreto, en este trabajo se pretende determinar, mediante experimentos de laboratorio, las tasas de incorporación de nitrato por la especie de carófito principal de la laguna Colgada, utilizando dos métodos distintos: (i) asimilación de  $N^{15}$  por los tejidos del vegetal y (ii) reducción de la concentración de nitrato en el agua a lo largo del tiempo. De esta forma se pretende finalmente calcular los valores de retención de N por parte de las praderas de carófitos en la laguna Colgada, elegida como representante de las lagunas de Ruidera.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de sedimento de la laguna Colgada que contenían esporas de *Chara hispida* y se trasladaron al laboratorio, donde se ubicaron en mesocosmos experimentales de plástico de 178 litros de capacidad (Figura 1). Los mesocosmos, que estaban situados en una planta piloto de acuarios de experimentación del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia, fueron rellenados cuidadosamente con agua del grifo de clorada. Los acuarios se iluminaron mediante tubos fluorescentes situados sobre la parte superior del mesocosmos y estaban sometidos a ciclos de iluminación día-noche. Se siguió la germinación y posterior crecimiento de los carófitos. Para ello, cada 15-30 días, se retiraban 10 ejemplares y se medía la longitud de su parte por encima del sustrato, de su rizoides y se determinaba su peso fresco y seco (tras 24 h a 70 °C), así como el número de nudos de los pies. A los 165 días tras la germinación se redujo la profundidad de la columna del agua sobre los macrófitos de forma que en estas condiciones la luz incidente (PAR) a nivel de la superficie del agua era de alrededor de  $40 \mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y se añadió nitrato al agua para reproducir las concentraciones medias habituales en la laguna Colgada (8-10 mgN- $\text{NO}_3/\text{L}$ ). Un 2% de ese nitrato fue  $\text{KN}^{15}\text{O}_3$ . Al cabo de 3 y de 6 días de incubación se extrajeron varios ejemplares de *Chara* para la determinación del %atm  $\text{N}^{15}$ . Previamente a la adición de  $\text{N}^{15}$  se retiró un par de carófitos para determinar su contenido en  $\text{N}^{15}$  natural. También se determinó el contenido en nitrógeno por unidad de peso seco de tejido vegetal mediante un analizador elemental Perkin Elmer 2400. Se determinaron a lo largo del tiempo las concentraciones de nitrato, fosfato y clorofila *a* en el agua (esta última variable para control del crecimiento del fitoplancton), así como el pH, la concentración de oxígeno disuelto y la temperatura del agua. Para la determinación del nitrato y del fosfato se utilizaron métodos analíticos estándar (A.P.H.A, 1989), para la determinación de la clorofila *a* se utilizó un fluorímetro Aquafluor (Turner Designs), y para el pH, la temperatura y el oxígeno se utilizó un medidor multiparamétrico WTW-Multiline F/Set3. La intensidad luminosa se midió con un sensor de radiación fotosintéticamente activa LI-COR modelo LI-250. Las tasas de incorporación de nitrógeno por los macrófitos se obtuvieron a partir de la reducción de la concentración de nitrato en el agua a lo largo del tiempo (Harlin y Wheeler, 1985), así como de la asimilación de  $\text{N}^{15}$  (Glibert y Capone, 1993) tras la adición de una fuente nitrogenada marcada isotópicamente. La tasa de incorporación mediante el primer método se calculó a partir de la diferencia entre la cantidad inicial y final de nitrato en el agua según:

$$\text{Tasa neta (mgN/gPS}\cdot\text{h)} = \frac{\text{mgN}_i - \text{mgN}_f}{t \cdot B}$$

donde  $\text{mgN}_i$  y  $\text{mgN}_f$  son las cantidades iniciales y finales, respectivamente de nitrato en el agua (concentración por volumen),  $t$  es el tiempo transcurrido (en horas) y  $B$  es la media entre la biomasa del macrófito inicial y final (gPS). La tasa de incorporación de  $\text{N}^{15}$  se calculó también a partir de la aparición del isótopo pesado en el tejido del macrófito según Frenette et al. (1996):

$$\text{Tasa incorporación específica de N (V}_N, \text{h}^{-1}) = \frac{\% \text{atomN}^{15} \text{muestra} - \% \text{atomN}^{15} \text{blanco}}{((\text{N}^{15} \text{añadido}/\text{N}^{15} \text{añadido} \cdot \text{DIN}) \cdot 100) - \% \text{atomN}^{15} \text{blanco}} \cdot t$$

$$\text{Tasa incorporación de N (mgN/h)} = \text{PON} \cdot \text{V}_N$$

donde  $\% \text{atomN}^{15} \text{muestra}$  es el porcentaje atómico presente en los carófitos,  $\% \text{atomN}^{15} \text{blanco}$  representa la abundancia natural de  $\text{N}^{15}$  en los tejidos de los carófitos,  $\text{DIN}$  es el nitrógeno inorgánico disuelto en el agua,  $t$  es el tiempo de incubación (en horas), y  $\text{PON}$  es el nitrógeno orgánico particulado contenido en los carófitos (en mg/gPS).

### 3. RESULTADOS

La tabla 1 resume las condiciones de crecimiento de los macrófitos en los acuarios. En la medida de lo posible se aproximan a los valores presentes en la laguna Colgada. Antes de la incorporación de nitrato, la parte de *Chara hispida* por encima del sustrato crecía con una tasa media de 0.17 cm/día (valor máximo 0.23 cm/día) (Figura 2). Los rizoides apenas aumentaron de longitud promedio con el paso del tiempo. La biomasa de los ejemplares individuales aumentaba a razón de 1.12 mgPF/día de media (valor máximo 2.1 mg/día). El incremento de peso seco fue de 0.16 mgPS/día. Los macrófitos crecían sin depósitos aparentes de carbonato cálcico sobre sus tejidos. El contenido en nitrógeno de los carófitos resultó ser del 3% del peso seco del tejido vegetal.

La tasa de incorporación de nitrógeno determinada mediante la técnica del isótopo  $\text{N}^{15}$  fue de 0.0165 mgN/gPS·h, mientras que la tasa de reducción estimada a partir de la reducción del nitrógeno en el agua (Figura 3) fue de 0.1435 mgN/gPS·h. El desarrollo del fitoplancton en la columna de agua del acuario no se incrementó significativamente después de la adición de nitrógeno, como lo indican los valores prácticamente constantes de clorofila  $a$  (Figura 3).

### 4. DISCUSIÓN

La capacidad de los carófitos de almacenar eficientemente nutrientes en lagos ha sido revisada recientemente por Kufel y Kufel (2002). En dicho trabajo se concluye que las praderas de macrófitos pueden actuar como una trampa eficiente de nutrientes en lagos con gran cobertura de macrófitos como es el caso de La Colgada. Nuestros datos de contenido en nitrógeno en el tejido de *Chara hispida* están en el rango de los mostrados para otras especies de carófitos (Kufel y Kufel, 2002). Asimismo, los datos obtenidos en el presente estudio sobre incorporación de nitrógeno mediante la técnica isotópica son próximos a los ofrecidos por Hough y Putt (1988) (en Kufel y Kufel, 2002) para *Chara vulgaris*. Con estos datos de incorporación de N por *Chara hispida* aquí obtenidos mediante experimentos de laboratorio se puede hacer una extrapolación al medio natural (con la prudente cautela que supone considerar el cambio de escala y las posibles diferencias entre el ambiente natural y el ambiente creado en el laboratorio) y calcular la incorporación de nitrógeno por las praderas de *Chara* en La Colgada. De esta forma se ha obtenido un valor de retirada de nitrógeno del agua por esta masa vegetal de 2.67 kgN/h.

En las condiciones de laboratorio ensayadas, el fitoplancton, pero principalmente las microalgas bentónicas (desarrolladas sobre todo en las paredes del acuario) y los carófitos son los agentes que reducen el nitrógeno del agua. En estas circunstancias, aproximadamente el 11.5% de la reducción se debe a *Chara hispida*, dato que nos ha sido posible determinar gracias a las técnicas isotópicas. Dado que la relación algas bentónicas:macrófito en un acuario es lógicamente superior al de una laguna como La Colgada, podemos sin duda considerar que como mínimo un 11.5 % del nitrógeno es eliminado del agua por los macrófitos. La biomasa de macrófitos en la laguna Colgada, aunque no presenta uno de los valores máximos encontrados en la literatura, sí es de los elevados (415gPS/m<sup>2</sup> de materia vegetal, descontando las incrustaciones de carbonato cálcico en forma de calcita que se disponen sobre los carófitos y que suponen el 60% del peso seco total). Dada esta elevada biomasa de macrófitos y su capacidad de incorporación de nitrógeno, pensamos que las praderas de *Chara hispida* retienen una importante cantidad del nitrógeno de la laguna.

## 5. AGRADECIMIENTOS

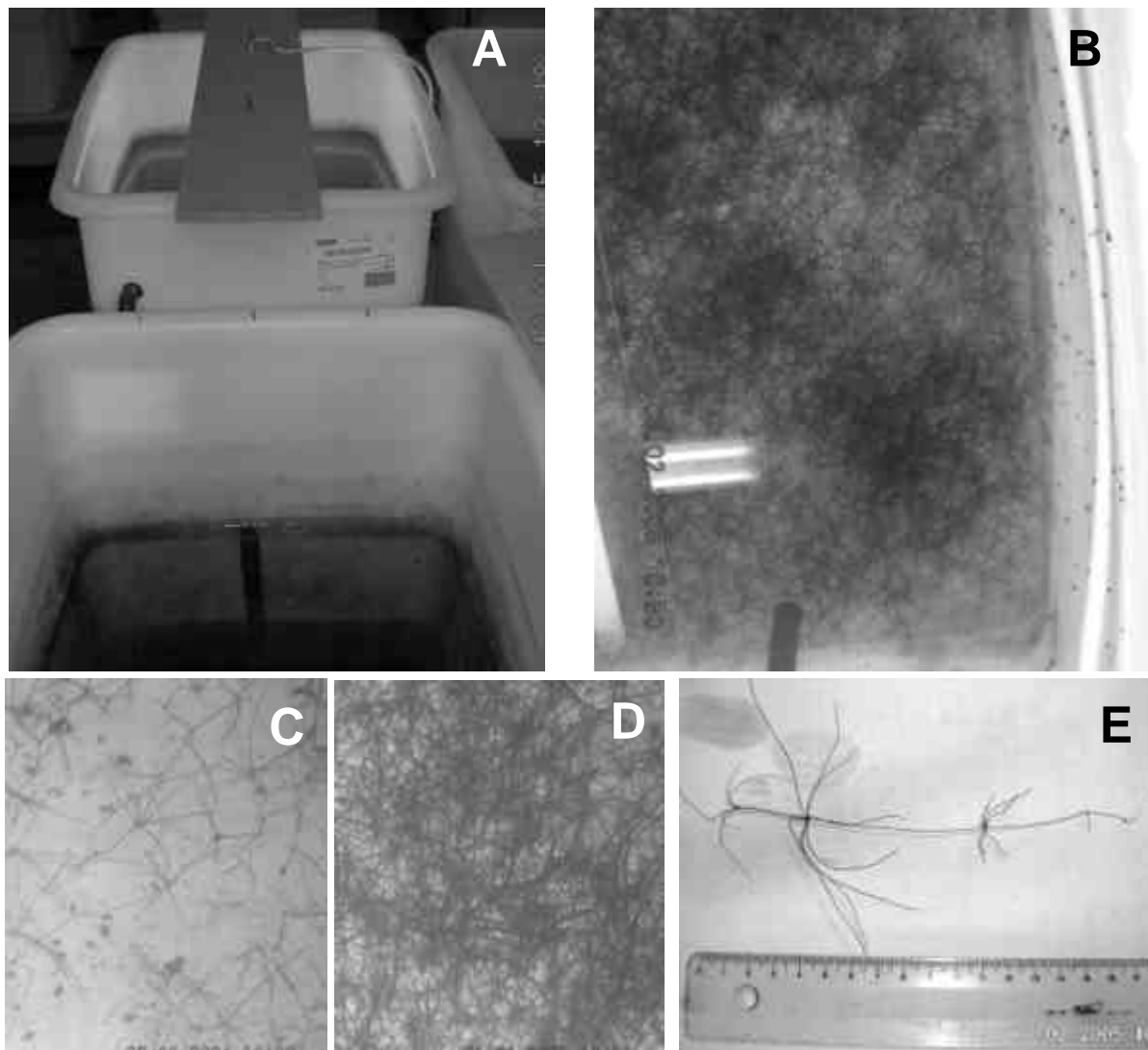
Los autores agradecen al Ministerio de Educación y Ciencia la financiación del proyecto REN2002-00558 / HID dentro del cual se ha realizado este trabajo. También agradecen a Lucas Cabrera y Silvia Piñeiro, técnicos de la Planta Piloto de Acuarios de Experimentación del SCSIE de la Universitat de València, su apoyo logístico en la realización de este estudio.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez Cobelas, M., R. Castelló, S. Cirujano, C. Rojo y M.A. Rodrigo (2004). Contaminación de las lagunas de Ruidera. Actas de las II Jornadas sobre el medio natural albacetense. Instituto de Estudios Albacetenses "Don Juan Manuel" (293-301).
- A.P.H.A., (1989). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 17<sup>th</sup> ed. Washington DC.
- Glibert, P.M. y D.G. Capone (1993). Mineralization and assimilation in aquatic, sediment, and wetland systems. En: R. Knowles, y T.H. Balckburn (Eds). *Nitrogen Isotope Techniques* (243-72). San Diego: Academic Press.
- Frenette, J.J., W.F. Vincent, L. Legendre y T. Nagata (1996). Size-dependent changes in phytoplankton C and N uptake in the dynamic mixed layer of Lake Biwa. *Freshwater Biology*, 36,221-236.
- Harlin, M.M. y P.A. Wheeler (1985). Nutrient uptake. En: M.M. Littler y D. Littler (Eds.). *Ecological field methods: Macroalgae. Handbook of Phycological methods*. Vol. IV. (493-508). New York: Cambridge University Press.
- Jeppesen, E. (1998). *The ecology of shallow lakes – Trophic interactions in the pelagial*. NERI Technical report n° 247. Ministry of Environment and Energy. National Environmental Research Institute. Silkeborg (Dinamarca). 358 pp.
- Kufel, L. e I. Kufel (2002). *Chara* beds acting as nutrient links in shallow lakes-a review. *Aquatic Botany*, 72(249-260).
- Vitousek, P.M., J. Aber, R.W. Howarth, G.E. Likens, P. A. Matson, D.W. Schindler, W.H. Schlesinger, y G.D. Tilman (1997). Human Alteration of the Global Nitrogen Cycle: Causes and Consequences. *Ecological Applications*, 7(737-750).

**Tabla 1. Valores de algunos variables del agua y del sedimento durante los experimentos de adición de N<sup>15</sup> en los mesocosmos con *Chara hispida*.**

|   |           |
|---|-----------|
| Temperatura agua (°C)                             | 18.9-19.2 |
| pH agua   | 7.2-7.6   |
| Oxígeno disuelto agua (mg/L)                      | 9.5-10.3  |
| Saturación de oxígeno (%)                         | 103-112   |
| Nitrógeno total en el sedimento (mgN/g peso seco) | 2.1       |
| Fósforo total en el sedimento (mgP/g peso seco)   | 0.11      |



**Figura 1. A y B: Mesocosmos para el cultivo de macrófitos. Detalle de *Chara hispida* en dos momentos de crecimiento: a los 21 días (C) y a los 57 días (D) tras la germinación. E: detalle de un pie de *Chara hispida*.**

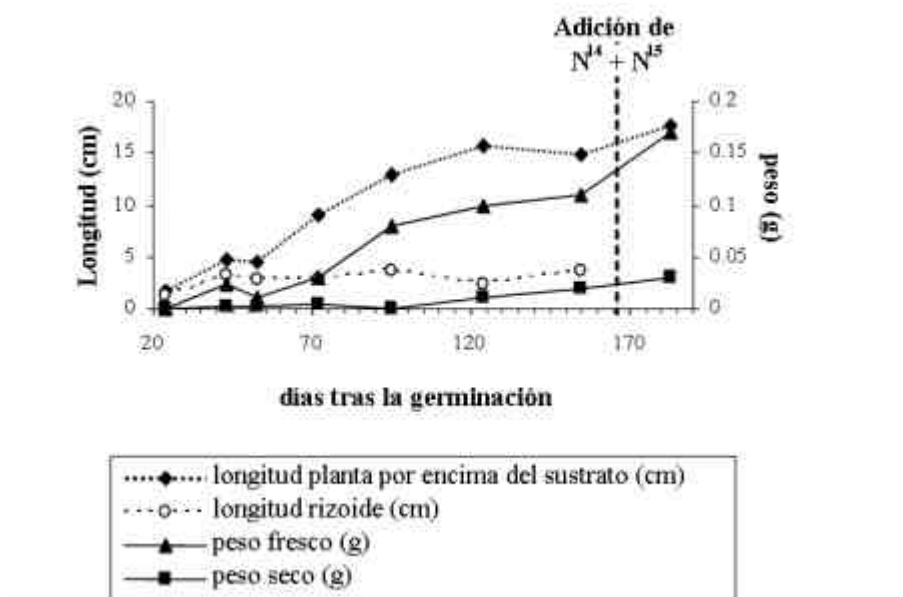


Figura 2. A: Crecimiento promedio de pies individuales de *Chara hispida*.

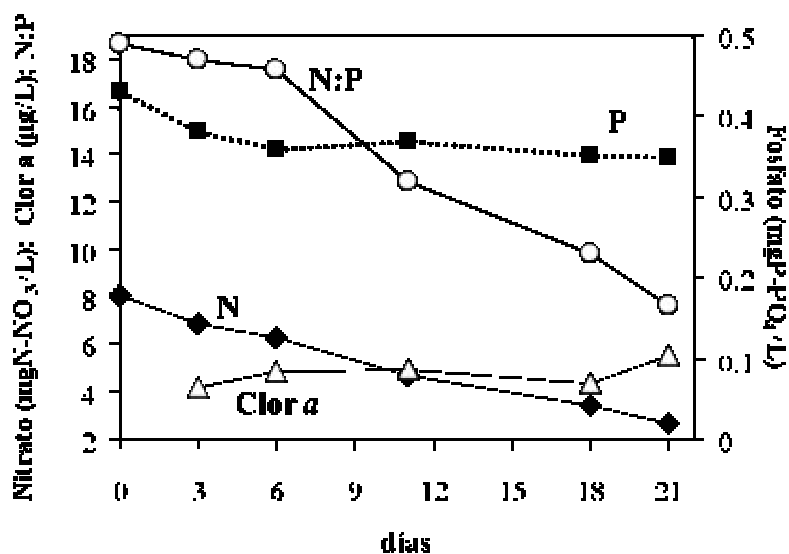


Figura 3. Variación en el tiempo de la concentración de nitrato, fosfato, (y la relación N:P) y la clorofila *a* en la columna de agua de los mesocosmos donde crecen los macrófitos tras la adición de nitrógeno ( $N^{14} + N^{15}$ ).