
Detección De Nitrógeno En Un Humedal Artificial De Flujo Subsuperficial Utilizando Métodos Espectroscópicos De Fluorescencia Y Reflectancia

Edison Rosero^a, Efraín Solarte^a, Adrián Fernández^b, Enrique Peña^b, Miguel Peña^c

^aGrupo de Óptica Cuántica, Universidad del Valle, A.A. 25360, Cali, Colombia;

^bDepartamento de Biología, Universidad del Valle, Cali, Colombia;

^cFundación CINARA, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

RESUMEN

Los humedales artificiales constituyen una manera eficiente, limpia y económica de remover contaminantes y materia orgánica presentes en el agua, remueven contaminantes por medio de una serie de procesos tales como: sedimentación física, filtración, precipitación química y absorción por medio de la vegetación. Se investigó la eficiencia de absorción de Nitrógeno en hojas de *heliconia psitacorum*, sembrada en un humedal artificial de flujo subsuperficial a escala de laboratorio utilizando técnicas espectroscópicas de fluorescencia corregida por reabsorción y reflectancia. Se logró estimar el contenido de nitrógeno de manera no destructiva. El uso de la técnica de fluorescencia (excitación: $\lambda = 460$ [nm],) permitió determinar variaciones en la concentración de clorofilas a través del tiempo, evidenciando procesos de asimilación de compuestos nitrogenados. Así mismo, se encontraron diferencias en la primera derivada de los espectros de reflectancia, que están directamente relacionados con la concentración de clorofila en la planta, y su respuesta fisiológica a los niveles de Nitrógeno a los cuales ha sido sometida, teniendo en cuenta una carga inicial de nitrógeno presente en el agua a tratar.

Palabras Clave: Fluorescencia, Clorofila, Nitrógeno, Fisiología Vegetal

ABSTRACT

Constructed wetlands are a very efficient, clean and economical way to remove organic contaminants from waste water. In the whole water cleaning process, some other complex processes, like physical sedimentation, filtration, chemical precipitation, and material absorption by vegetation, are involved. The Nitrogen absorption efficiency by *heliconia psitacorum*, was studied at laboratory scale in a small reactor simulating a subsurface flow constructed wetland. Chlorophyll increasing was measured by fluorescence, using ($\lambda=460$ [nm]) as excitation light. Besides, spectral differences were observed in the spectral signal and in its derivative, indicating changes in the plant physiological response.

Keywords: Fluorescence, Chlorophyll, Nitrogen, Plant Physiology.

1. INTRODUCCIÓN

Los humedales artificiales son áreas constituidas por un subsuelo poroso (usualmente grava) a través del cual fluye el agua y en donde usualmente se tienen plantas emergentes. De acuerdo con el patrón de flujo y con el medio aplicado, los humedales artificiales se dividen en dos tipos de sistemas: el de flujo superficial (SF) y el de flujo subsuperficial (SSF). En los dos tipos de sistemas existe una variedad de procesos fisicoquímicos y biológicos complejos tales como la absorción a través plantas, de microorganismos y de sedimentación y la adsorción, en medio por los cuales un contaminante puede ser removido de agua. La evaluación de la remoción de elementos contaminantes, como el nitrógeno presente en las aguas residuales, es un problema actual de investigación en esta área, debido a las consecuencias negativas sobre la salud humana y a los efectos adversos sobre la ecología acuática que se generan como consecuencia de una alta concentración de este elemento en las fuentes hídricas. Los mecanismos de remoción de nitrógeno en humedales incluyen la absorción de nitrógeno por las plantas con el objetivo de sintetizar proteínas, la absorción por microorganismos, la nitrificación, la de-nitrificación, la volatilización del amonio y el intercambio iónico entre el amonio y el medio. Los humedales artificiales han demostrado potencial para remover nitrógeno de aguas residuales¹; sin embargo, se ha encontrado variabilidad en los rendimientos de diferentes sistemas que trabajan en las mismas condiciones climáticas, que en buena parte puede atribuirse a la ausencia de una teoría integradora de todos los factores y

procesos involucrados en los mecanismos de remoción. Este trabajo se centra en la detección de la asimilación de nitrógeno por parte de la *Heliconia Psittacorum*, sembrada en un humedal artificial de flujo subsuperficial a escala de laboratorio, mediante el uso de técnicas espectroscópicas de Fluorescencia y Reflectancia, con el fin de evaluar la importancia de la vegetación en la remoción de compuestos nitrogenados en los sistemas tipo humedal artificial de flujo subsuperficial; partiendo del hecho de que estudios experimentales sobre remoción de nitrógeno en humedales artificiales, confirman que los humedales que no son plantados, exhiben una baja remoción, comparados con los plantados².

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Fluorescencia de Clorofila

El nitrógeno absorbido por las plantas es utilizado en la síntesis de proteínas, enzimas y clorofila, siendo posible estimar dicho nitrógeno absorbido, al cuantificar la cantidad de estructuras presentes en la hoja, en las cuales éste es utilizado. Dado que las propiedades espectrales de absorción y emisión de la clorofila permiten una adecuada cuantificación de esta molécula mediante técnicas espectroscópicas, es posible establecer de forma indirecta el contenido de nitrógeno presente en hojas de plantas, aprovechando que la molécula de clorofila presenta fluorescencia. El espectro de emisión del sistema fotosintético, compuesto por clorofilas, al interior de una hoja verde a temperatura ambiente, está caracterizado por un máximo angosto en la región del rojo entre 685-690 nm y un máximo ancho en la región del rojo lejano alrededor de 730-740 nm. Adicional a esto, se presentan diferencias en la intensidad del espectro cuando se mide la emisión por el lado superior de la hoja (haz) y por el lado inferior (Envés). Esta es una característica general de las hojas, las cuales poseen una alta densidad de clorofilas en las células en empalizada del parénquima del haz; contrario a el número de clorofilas presentes en el envés. La explicación de las diferencias en la fluorescencia de la clorofila, medidas en el haz y el envés, es el grado de reabsorción debido a las diferencias de contenido de clorofila. La reabsorción de radiación ocurre porque los espectros de absorción y de emisión se superponen en una región común del espectro (rojo 730-740 nm).

A medida que aumenta el tiempo de permanencia en el humedal, la planta se desarrolla al absorber compuestos nitrogenados presentes en el agua residual, mejorando su tasa de crecimiento y exhibiendo gran capacidad para aumentar su biomasa y con esto el número y la densidad de moléculas de clorofila. Se ha verificado que, en estados avanzados de desarrollo, la intensidad del espectro de fluorescencia medido no es proporcional al número de moléculas ya que, al existir una alta densidad de clorofila, la reabsorción de radiación es considerable.

2.1. Determinación del espectro efectivo de fluorescencia

Es posible calcular el espectro de fluorescencia efectivo que emite una hoja al ser excitada con una densidad de energía espectral dada, al examinar las propiedades de transmisión y reflexión de radiación del tejido vegetal. La detección y análisis de la radiación reflejada por las plantas, está principalmente determinada por las propiedades superficiales de las hojas y su estructura interna, de modo que a través de este procedimiento, es posible encontrar características espectrales que reflejan un aumento en la concentración de estructuras que son fabricadas por la planta, con base en el nitrógeno incorporado. El porcentaje de luz reflejada $R(\lambda)$ se calcula experimentalmente como:

$$R(\lambda) = \frac{S_R(\lambda) - D(\lambda)}{R_0(\lambda) - D(\lambda)} \times 100 \quad (1)$$

Siendo $S_R(\lambda)$ igual a la cantidad de luz reflejada por la hoja, $R_0(\lambda)$ es la intensidad de referencia obtenida con un blanco de referencia estándar de sulfato de bario (99%), $D(\lambda)$ es la intensidad de fondo o 'ruido'. Un cálculo similar aplica para transmisión.

Se han desarrollado y evaluado, diversos métodos para calcular el espectro de fluorescencia efectivo³, llegando a la conclusión de que uno de los modelos más adecuados para la corrección del espectro de fluorescencia emitido por una sola hoja vegetal es el propuesto por G. Agati⁴. En éste modelo se asume que la densidad espectral de energía incidente sobre la superficie de la hoja, se atenúa exponencialmente al interactuar con capas infinitesimales de tejido. Asimismo, se establece que la emisión de fluorescencia es isotrópica al interior de la hoja, y que ésta se atenúa exponencialmente por re-absorción en el tejido. El esparcimiento de la radiación se considera al asumir una longitud de camino óptico efectiva, la cual es válida tanto para la luz que ingresa en el tejido como para la luz que sale de éste. Las propiedades experimentales de reflexión y transmisión son incluidas al establecer el hecho de que la fracción de radiación que no ha

sido absorbida por la hoja debe ser igual a la suma de estas dos cantidades representadas respectivamente como $R(\lambda)$ y $T(\lambda)$.

De acuerdo con este modelo, el espectro de fluorescencia efectivo, I_F^e , se puede expresar en función del espectro de fluorescencia medido, I_F^m , considerando la reflexión y la transmisión experimentalmente obtenidas, por medio de la ecuación:

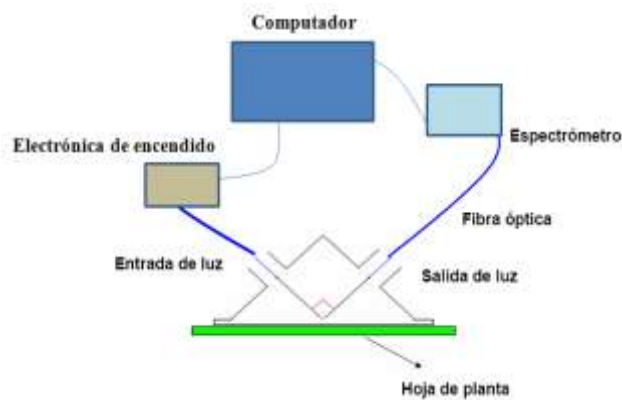
$$I_F^e = I_F^m \left[\frac{\text{Ln}\left(\frac{1}{R_0 + T_0}\right) + \text{Ln}\left(\frac{1}{R + T}\right)}{\text{Ln}\left(\frac{1}{R_0 + T_0}\right)} \frac{1 - R_0 - T_0}{1 - R_0 + T_0 - R + T} \right] \quad (2)$$

Donde R_0 y T_0 representan la cantidad de radiación reflejada y transmitida por la hoja en la región del espectro correspondiente a la excitación. R y T corresponden respectivamente a la reflexión y transmisión de luz en la región del espectro en la cual se observa el proceso de emisión fluorescente. De la ecuación anterior, es posible obtener el espectro de emisión fluorescente efectivo, debido a la distribución de moléculas de clorofila en el interior de la hoja. Debido a que el nitrógeno absorbido es empleado en la síntesis de clorofilas, un incremento en este tipo de moléculas, debe evidenciar absorción de nitrógeno por parte de la planta, siendo posible estimar dicha cantidad al considerar el espectro de fluorescencia efectivo el cual es proporcional al número de moléculas presentes en la hoja.

3. MÉTODO EXPERIMENTAL

3.1. Espectroscopia de Fluorescencia

En este trabajo se ha realizado un estudio *in vivo*, determinando las variaciones del espectro efectivo de emisión de fluorescencia de la clorofila de las hojas de *Heliconia psittacorum*. Como el estado excitado de clorofila, posee varios caminos de decaimiento diferentes al de emisión fluorescente, que disminuyen la emisión de fluorescencia, estos procesos deben ser minimizados. Con el objetivo de disminuir los efectos del proceso fotosintético y de la disipación de energía como calor, las hojas fueron adaptadas a la oscuridad durante una hora, antes de iniciar la medida. Así pues, las mediciones fueron realizadas en horas de la noche. Para cada hoja, se tomaron 6 espectros en diferentes zonas la hoja. La excitación molecular se obtuvo al irradiar la hoja con un diodo emisor de luz (LED) de alta luminiscencia, que emite en la región del azul, con una longitud de onda máxima de 470 [nm] y un ancho medio de 30 [nm]. El diodo y su voltaje de operación (2,90 [V]), permanecieron sin cambio a lo largo de todo el periodo de medición. La potencia promedio de emisión del diodo fue de 0.01 [mW]. El montaje experimental utilizado para medida de la fluorescencia se presenta en la Figura 2.



2a)



2b)

Figura 2. El esquema del montaje experimental se presenta la Figura 2a. Los equipos utilizados para adquisición de espectros de fluorescencia y un detalle de la implementación en el sitio de medida se presentan en la Figura 2b). Los humedales SSF a escala de laboratorio construidos en los recipientes que se identifican en la foto de la derecha.

Para llevar la luz excitadora a las hojas y recoger la luz de fluorescencia, se diseñó y construyó un sistema óptico que consta de un acoplador para las fibras ópticas, fabricado en aluminio, que permite incidir con la luz de excitación (diodo) a 45° sobre la superficie de la hoja y recoger la emisión fluorescente en ángulo recto con respecto a la dirección de incidencia; y además, para recolectar la emisión fluorescente, utiliza de una lente con un filtro de color que reduce la intensidad de la radiación azul que es esparcida en la dirección de la lente colectora. Esta lente se conecta a una fibra óptica de 200 $[\mu\text{m}]$, cuya función es enviar la señal de fluorescencia al espectrofotómetro (USB4000[®] controlado por el software SpectraSuite[®], de OceanOptics), para su respectivo análisis. Adicionalmente, se construyó un circuito que coordina el encendido del diodo con el momento en el cual el equipo comienza a adquirir datos, en modo de adquisición rápida, de forma que todos los espectros fueron tomados en un tiempo de 25 [ms]. Las mediciones se realizaron en el vivero de la Estación Experimental de Biología de la Universidad del Valle.

3.2. Espectroscopia de Reflexión y Transmisión.

La reflexión y transmisión se midieron posteriormente a las medidas de fluorescencia realizadas, con una hora de permanencia en la oscuridad entre cada medida. Se utilizó una sonda de reflectancia, de 200 $[\mu\text{m}]$ OceanOptics, y una fibra óptica de 200 $[\mu\text{m}]$ para colectar la luz transmitida a través de la hoja. Como fuente luminosa, se usó una lámpara de tungsteno con una distribución espectral de intensidades desde los 350 [nm] hasta los 1000 [nm], al igual que en las mediciones de fluorescencia, la lámpara utilizada no fue reemplazada durante el transcurso de las mediciones. Se diseñó un sistema mecánico en aluminio que permite fijar la hoja y acoplar la sonda de reflectancia y la fibra detectora directamente sobre la hoja. Los detalles de este montaje se muestran en la Figura 3. Debido a que en cada humedal se sembraron 5 plantas de características similares, las medidas espectroscópicas fueron realizadas sobre cada una de las hojas de todas las plantas sembradas en el humedal.



Figura 3. La fotografía muestra el montaje utilizado para la adquisición de espectros de Reflectancia y Transmitancia. El detalle, en la parte inferior, presenta el adaptador diseñado para fijar la hoja y acoplar las fibras ópticas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 4 se presentan espectros típicos de reflexión de una de las hojas estudiadas, corresponde a la hoja 6 de la planta 28. Se observa que la reflexión obtenida en la región azul es cercana a cero, esto es debido a la fuerte absorción de las moléculas de clorofila *a* y *b*. Se observa un máximo de reflectancia en la región del verde, que varía a medida que el tejido va aumentando aumenta su contenido clorofílico, pero que decae posteriormente a medida que la planta aumenta su densidad, lo que se evidencia en el color verde oscuro de las hojas. En la Figura 5 se presentan espectros típicos de transmitancia, comparados con los correspondientes de reflectancia, y en la Figura 6 se presentan las correspondientes mediciones de absorbancia para la misma hoja utilizada en las mediciones presentadas en la Figura 5.

En la frontera del rojo (680-750 nm), se identifica una zona de absorción de radiación, debida principalmente al contenido clorofílico. En el infrarrojo cercano, gran parte de la luz incidente es esparcida por el tejido del parénquima esponjoso que posee un bajo contenido de clorofila⁵. Como la característica de absorción clorofílica, centrada alrededor de 670 nm, se ensancha para hojas con un contenido de clorofila mayor, al calcular la primera derivada del espectro de reflexión, se observa un corrimiento del máximo de ésta, hacia longitudes de onda mayores⁶. Ya que la posición del máximo de la primera derivada del espectro de reflexión está determinada principalmente por el incremento o disminución del contenido clorofílico es posible, por medio de este procedimiento, utilizarla para identificar un incremento o disminución del nitrógeno absorbido.

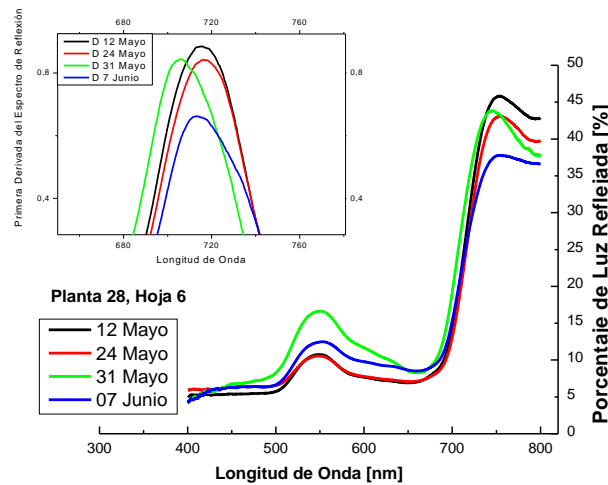


Figura 4. Espectros de Reflexión obtenidos para la hoja 6 de la planta 28, en observaciones a lo largo de un mes. En el recuadro superior izquierdo se observa el máximo de la primera derivada del espectro de reflexión para cada una de las medidas.

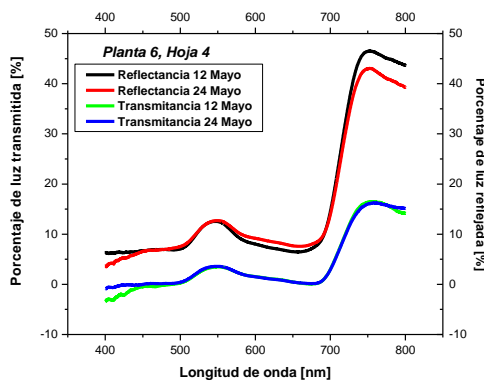


Figura 5. Mediciones espectrales típicas de Reflectancia y Transmittancia obtenidas para la hoja 4 de la planta 6.

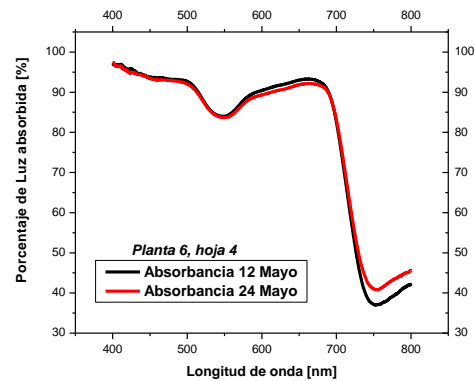


Figura 6. Absorbancia espectral correspondiente a las mediciones de la Figura 5.

En la Figura 7 se presentan resultados típicos de la medida espectral de fluorescencia y de la determinación del espectro efectivo, relacionado con el medido y las mediciones de reflexión y transmisión por medio de la ecuación (2). El área del espectro efectivo de fluorescencia obtenido en cada medida es proporcional al número de moléculas de clorofila *a* y *b*, y por lo tanto revela la concentración de nitrógeno en el instante de la medida. Como ilustración, se puede calcular de los espectros efectivos de la Figura 7 las siguientes áreas: $410821[\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}] \pm 6.5\%$, para el 9 de abril y de $507364 [\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}] \pm 4.2\%$, para el 13 de abril. Siendo posible estimar un aumento porcentual del contenido de nitrógeno del un $(23 \pm 2) \%$, para el 9 al 13 de abril para la planta etiquetada 6, en su hoja numerada 1. Las determinaciones realizadas por el grupo de

Fisiología Vegetal del Departamento de Biología de la Universidad del Valle, mediante la técnica micro-Kjeldahl (APHA-Standard Methods) para la obtención del nitrógeno foliar, dentro de éste mismo proyecto, han mostrado valores compatibles con los encontrados por este método óptico [7].

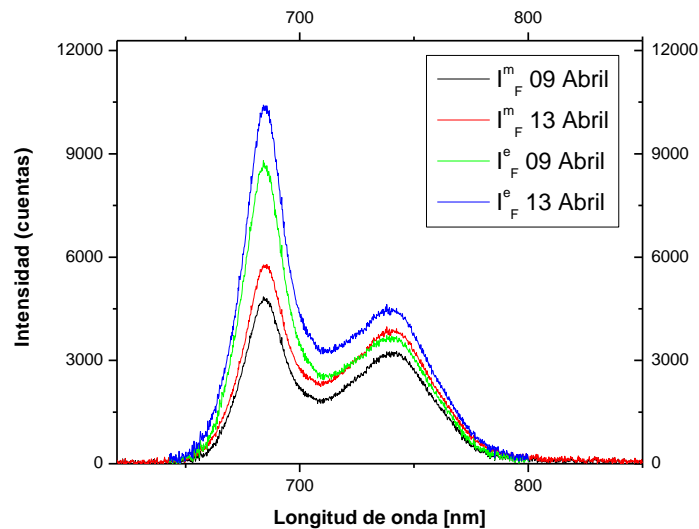


Figura 7. Curvas Típica de fluorescencia Medida y Efectiva.

5. CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias en los espectros de fluorescencia, reflexión y transmisión, atribuibles a la variación en el contenido de moléculas de clorofila *a* y *b*, revelando los cambios en la concentración del nitrógeno asimilado por la planta a lo largo del tiempo de permanencia en el humedal reactor. Por medio de este análisis se obtuvieron valores del contenido porcentual de nitrógeno, que son compatibles con los encontrados con la utilización de una técnica química estándar. Estos resultados alientan el diseño de un método óptico, aplicable *in situ*, y en tiempo real para la determinación del nitrógeno acumulado en la plantas de un humedal artificial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Valle (VRIN, DECFAC, VRBU) el apoyo financiero y logístico para la realización y presentación de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Huang *et al*, "Nitrogen Removal in Constructed Wetlands Employed to Treat Domestic Wastewater", *Water Resource*. **34**, pp. 9ss, 2000.
2. J. Iamchaturapatr, S.W. Yi, J.S. Rhee, "Nutrient Removals by 21 Aquatic Plants for Vertical Free Surface Flow Constructed Wetland". *Ecological Engineering*. **29**, pp. 287-293, 2007.
3. G.B. Cordón, M.G. Lagorio. "Reabsorption of Chlorophyll Fluorescence in Leaves revisited. A Comparison of Correction Models". *Photochemical and Photobiological Sciences*. **5**, pp.735-740, 2006.
4. G. Agati, F. Fusi, P. Mazzinghi, "A simple Approach to the Evaluation of the Reabsorption of Chlorophyll Fluorescence Spectra in Intact Leaves". *Photochemical and Photobiological Sciences B*. **17**, pp.163-171, 1993.
5. M. Seyfried, L. Fukshansky, Light Gradients in Plant Tissue. *Applied Optics*. **22**, pp.1402-1408, 1983.
6. O. Mutanga, A. Skidmore, Red Edge Shift and Biochemical Content in Grass Canopies. *Photogrammetry and Remote Sensing*. **62**, pp. 34-42, 2007.
7. A. Fernández, "Evaluación de la Tasa de Asimilación y Remoción de Nitrógeno por *heliconnia psitacorum* en Humedales Artificiales Subsuperficiales Para el Tratamiento de Agua Residual". Tesis de Pregrado. Universidad del Valle, 2008.