



ESCUELA DE POSTGRADO
DOCTORADO EN GESTION AMBIENTAL

EFFECTO INHIBITORIO DE *CHARA BRAUNII* Gmelin EN EL CRECIMIENTO
POBLACIONAL DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

María Victoria López Pereira

Encarnación, Paraguay

2018

María Victoria López Pereira

TÍTULO DE LA TESIS

Tesis preparada a la Universidad Nacional de Itapúa
como requisito parcial para la obtención del título
de Doctora en gestión ambiental

Tutora: Dra. Estelvina Rodríguez Portillo

Encarnación, Paraguay

2018



“El Programa de Postgrado **Doctorado en Gestión Ambiental** Código 14-POS-015 es cofinanciado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEI”.

Institución ejecutora del programa: Universidad Nacional de Itapúa



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ITAPÚA
ESCUELA DE POSTGRADO**

“Efecto inhibitorio de *Chara Braunii* Gmelin en el crecimiento poblacional de *Microcystis aeruginosa*”

AUTORA

María Victoria López Pereira

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
DOCTORA EN GESTIÓN AMBIENTAL

JURADO EXAMINADOR DE TESIS

Dr. Juan José Bonnin Acosta

Dr. Christian Vogt Penzkofer

Dr. Ing. Jorge Daniel González Villalba

Dra. Graciela Beatriz Gavazzo

RESULTADO DE LA EVALUACIÓN: Aprobado.

Encarnación, 17 de noviembre de 2018
Lugar y Fecha de Aprobación

Dedico esta tesis a:

Jesús, mi gran amigo...

A Venancio López (papá), gran ayudante de

laboratorio

A Isabel Pereira Atienza (mamá), la mejor

compañera de campo y viajes

Agradezco a:

Siendo la ciencia solidaria para su continua evolución, agradezco a aquellos que comprendiendo dicha cualidad han aportado su ayuda a esta investigación en el transcurso del largo camino recorrido;

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por su confianza y apoyo en a esta investigación.

A la **Dra. Estelvina Rodríguez** por confiar en la investigación, creer en mi capacidad, ser la calma en momentos de debilidad y acompañarme en este largo camino de hacer ciencia en el cual seguiré aprendiendo toda la vida.

A la **Dra. Célia Leite Sant'Anna**, de la Universidad de São Paulo, Brasil; por transmitirme sus conocimientos y valiosa colaboración en este trabajo.

Al **Dr. Santos Cirujano Bracamontes**, del Real Jardín Botánico de Madrid por su aporte en el conocimiento en la identificación de la planta acuática y su el maravilloso regalo enviado desde la madre patria.

A la **Dra. Silvia Bonilla**, de la Universidad de la República del Uruguay, por su tiempo y pasión trasmitidos en el curso de cianobacterias planctónicas en Montevideo, Uruguay, experiencia inolvidable.

Al **equipo del Laboratorio del agua** de la Universidad Nacional de Itapúa, por su paciencia y espacios cedidos para la presente investigación.

Al **Prof. Pablo Kiernyezny**, por su colaboración y disponibilidad para el análisis estadístico de la investigación

A mis padres Venancio e Isabel, quienes me dieron fortaleza y creyeron en mí, aun cuando yo no lo hacía. Por ayudarme a mantenerme en pie a lo largo de la vida.

"Si puedes soñarlo, puedes lograrlo" DISNEY, W. 1965.

Lista de Tablas

Tabla 1 Operacionalización de variables	26
Tabla 2 Sitio y fechas de muestreo y coordenadas geográficas Tabla 2 Sitio y fechas de muestreo y coordenadas geográficas	28
Tabla 3 Ficha del ejemplar de referencia	32
Tabla 4 Índice de abundancia relativa aplicado a <i>Microcystis aeruginosa</i> en el embalse Tacuary, ParaguayTabla.....	35
Tabla 5 Índice de Braun Blanquet aplicado a <i>Chara Braunii</i> para determinar escala de cobertura en el embalse Tacuary, Paraguay	35
Tabla 6 Promedio anual de parámetros fisicoquímicos en los puntos de muestreo.....	43
Tabla 7 Promedio de parámetros fisicoquímicos medidos in situ en los puntos muestreos	44
Tabla 8 Ln de la concentración celular, tasa de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (Td), temperatura del cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> ($^{\circ}\text{C}$)	48
Tabla 9 Densidad estacional de especies en los sitios de muestreo del embalse Tacuary, Paraguay (Parcela de 1x1m)	53
Tabla 10 Porcentaje menor de ácidos grasos	71
Tabla 11 Efecto inhibitorio (%) de extracto de <i>Chara Braunii</i> en cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> 3mL.....	75
Tabla 12 Efecto inhibitorio (%) de extracto de <i>Chara Braunii</i> en cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> 5mL.....	75
Tabla 13 Efecto inhibitorio (%) de extracto de <i>Chara Braunii</i> en cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> 10mL.....	76

Tabla 14 Efecto inhibitorio (%) de extracto de <i>Chara Braunii</i> en cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> 20mL.....	76
Tabla 15 Efecto inhibitorio (%) de extracto de <i>Chara Braunii</i> en cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> FLORACION MEDIO NATURAL 5mL.....	77
Tabla 16 Resultados del Análisis de Varianza para Cel/mL por DIAS	78
Tabla 17 Pruebas de Múltiple Rangos para Cel/mL por DIAS. Método: 95,0 porcentaje LSD...	79
Tabla 18 ANOVA para IR por DOSIS	82
Tabla 19 Pruebas de Múltiple Rangos para IR por DOSIS. Método: 95,0 porcentaje LSD.....	83

Lista de Gráficos

Gráfico 1 Secuencia de repique de cultivo aislado	33
Gráfico 2 Curva de crecimiento <i>Microcystis aeruginosa</i>	46
Gráfico 3 Curva de temperatura del cultivo.....	47
Gráfico 4 Curvas de competencia interespecífica entre <i>Chara Braunii</i> y <i>Microcystis aeruginosa</i> en el embalse Tacuary PUNTO 1	54
Gráfico 5 Curvas de competencia interespecífica entre <i>Chara Braunii</i> y <i>Microcystis aeruginosa</i> en el embalse Tacuary PUNTO 2	54
Gráfico 6 Curvas de competencia interespecífica entre <i>Chara Braunii</i> y <i>Microcystis aeruginosa</i> en el embalse Tacuary PUNTO 3	55
Gráfico 7 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> (N1) y <i>Microcystis aeruginosa</i> (N2), durante la estación otoño PUNTO 1	56
Gráfico 8 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> (N1) y <i>Microcystis aeruginosa</i> (N2), durante la estación otoño PUNTO 2	56
Gráfico 9 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> (N1) y <i>Microcystis aeruginosa</i> (N2), durante la estación otoño PUNTO 3	57
Gráfico 10 Curvas de competencia interespecífica estación invierno, dados los porcentajes de densidad de especies PUNTO 1	58
Gráfico 11 Curvas de competencia interespecífica estación invierno, dados los porcentajes de densidad de especies PUNTO 2	58
Gráfico 12 Curvas de competencia interespecífica estación invierno, dados los porcentajes de densidad de especies PUNTO 3	59

Gráfico 13 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> (N1) y <i>Microcystis aeruginosa</i> (N2), durante las estación invierno PUNTO 1	60
Gráfico 14 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> . (N1) y <i>Microcystis</i> (N2), durante las estación invierno PUNTO 2.....	60
Gráfico 15 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> (N1) y <i>Microcystis aeruginosa</i> (N2), durante las estación invierno PUNTO 3	61
Gráfico 16 Curvas de competencia interespecífica PUNTO 1	62
Gráfico 17 Curvas de competencia interespecífica PUNTO 2	62
Gráfico 18 Curvas de competencia interespecífica PUNTO 3	63
Gráfico 19 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> (N1) y <i>Microcystis aeruginosa</i> (N2), durante las estación primavera PUNTO 1	64
Gráfico 20 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> (N1) y <i>Microcystis aeruginosa</i> (N2), durante las estación primavera PUNTO 2	64
Gráfico 21 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> (N1) y <i>Microcystis aeruginosa</i> (N2), durante las estación primavera PUNTO 3	65
Gráfico 22 Curvas de competencia interespecífica PUNTO 1	66
Gráfico 23 Curvas de competencia interespecífica PUNTO 2	66
Gráfico 24 Curvas de competencia interespecífica PUNTO 3	67
Gráfico 25 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> (N1) y <i>Microcystis aeruginosa</i> (N2), durante la estación verano PUNTO 1	68
Gráfico 26 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> (N1) y <i>Microcystis aeruginosa</i> (N2), durante la estación verano PUNTO 2	68

Gráfico 27 Trayectoria de crecimiento de <i>Chara Braunii</i> (N1) y <i>Microcystis aeruginosa</i> (N2), durante la estación verano PUNTO 3	69
Gráfico 28 Porcentaje de ácidos grasos en <i>Chara Braunii</i>	70
Gráfico 29 Concentración celular de <i>Microcystis aeruginosa</i> con la aplicación de 3 mL	72
Gráfico 30 Concentración celular de <i>Microcystis aeruginosa</i> con 5 mL del extracto de <i>Chara Braunii</i>	72
Gráfico 31 Curva de crecimiento celular de <i>Microcystis aeruginosa</i> con 10 mL de esencia de <i>Chara Braunii</i>	73
Gráfico 32 Curva de crecimiento celular de <i>Microcystis aeruginosa</i> con 13 mL de esencia de <i>Chara Braunii</i>	73
Gráfico 33 Curva de crecimiento celular de <i>Microcystis aeruginosa</i> con 13 mL de esencia de <i>Chara Braunii</i>	74
Gráfico 34 Gráfico del comportamiento de las medias de Cel/mL en función de días	80
Gráfico 35 Gráfico de cajas y bigotes. Cel/mL según días	81
Gráfico 36 Comportamiento de las medias de IR en función de dosis	84
Gráfico 37 Gráfico de cajas y bigotes. Cel/mL según días	85

Lista de Ilustraciones

Ilustración 1 Diagrama simplificado de causas que determinan las floraciones de cianobacterias en sistemas acuáticos	16
Ilustración 2 Distribución de Chara Braunii Gmelin en embalse Tacuary, Itapúa, periodo-Primavera, 2016	22
Ilustración 3 Diseño de fotobiorreactor	38
Ilustración 4 Diseño de dosificación experimental del extracto	39
Ilustración 5 Localización del área de puntos de muestreo	41
Ilustración 6 Punto de muestreo 3. Floración alga en el embalse Tacuary. Fecha: 24-03-2018 ..	42
Ilustración 7- 8. Colonias de <i>Microcystis aeruginosa</i> del embalse Tacuary, Carmen del Paraná	45
Ilustración 8 Brácteas y Oogonios (1,25 μ)	49
Ilustración 9 <i>Chara Braunii</i> con rizoides.....	50
Ilustración 10 Talo	50
Ilustración 11 Acícula.....	51
Ilustración 12 Muestreo de fitoplancton en el embalse Tacuary. Fecha: Enero-2018	107
Ilustración 13 Muestreo de fitoplancton en lago Ypacarai-Fecha: Febrero -2017	107
Ilustración 14 Muestreo de fitoplancton embalse Tacuary-Febrero-2017	108
Ilustración 15 Lectura de parámetros fisicoquímicos in situ en puntos de muestreo-Febrero-2018	108
Ilustración 16 Preparación de medio de cultivo BG11	109
Ilustración 17 Ajuste de pH del medio a 7,1	109
Ilustración 18 Preparación de medio de cultivo BG11	110
Ilustración 19 Ilustración 18-19. Preparación de medio de cultivo BG11	110

Ilustración 20 Esterilización de materiales para cultivo	111
Ilustración 21 Trabajo de observación y aislamiento de <i>Microcystis aeruginosa</i>	111
Ilustración 22 Observación e identificación para aislamiento	112
Ilustración 23 Observación e identificación para aislamiento	112
Ilustración 24 Cultivo en tubos para repique	113
Ilustración 25 Oxigenación manual	113
Ilustración 26 Prueba de fotobiorreactor.....	114
Ilustración 27 Prueba de fotobiorreactor.....	114
Ilustración 28 Prueba de fotobiorreactor.....	114
Ilustración 29 Prueba de fotobiorreactor.....	114
Ilustración 30 . Muestreo de <i>Chara Braunii</i> , embalse Tacuary, Punto 3.....	115
Ilustración 31 . Muestreo de <i>Chara Braunii</i> , embalse Tacuary, Punto 3.....	115
Ilustración 32 Muestras de <i>Chara Braunii</i> , embalse Tacuary. Punto 2	116
Ilustración 33 Muestras de <i>Chara Braunii</i> , embalse Tacuary. Punto 2	116
Ilustración 34 Muestreo e identificación del carófito	117
Ilustración 35 Muestreo e identificación del carófito	117
Ilustración 36 Brácteas y oogonio.....	118
Ilustración 37 Oogonio (1,25 μ)	118
Ilustración 38 Lavado y pesaje de <i>Chara Braunii</i> para análisis	119
Ilustración 39 Lavado y pesaje de <i>Chara Braunii</i> para análisis	119
Ilustración 40 Lavado y preparación de <i>Chara Braunii</i> para extracción de esencia	120
Ilustración 41 Lavado y preparación de <i>Chara Braunii</i> para extracción de esencia	120
Ilustración 42 Elaboración del extracto de <i>Chara Braunii</i>	121

Ilustración 43 Elaboración del extracto de <i>Chara Braunii</i>	121
Ilustración 44 Dosificación del extracto en cultivos de <i>Microcystis aeruginosa</i>	122
Ilustración 45 Dosificación del extracto en cultivos de <i>Microcystis aeruginosa</i>	122
Ilustración 46 Recuento diario de concentración celular en cámara Neubauer	123
Ilustración 47 Recuento diario de concentración celular en cámara Neubauer	123
Ilustración 48 Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> con concentración del extracto de <i>Chara Braunii</i>	124
Ilustración 49 Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> con concentración del extracto de <i>Chara Braunii</i>	124
Ilustración 50 Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> con concentraciones del extracto de <i>Chara Braunii</i>	125
Ilustración 51 Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> con concentraciones del extracto de <i>Chara Brauni</i>	125

Lista de Abreviaturas

APA American Psychological Association

IR Rango Inhibitorio

Tabla de Contenido

Efecto inhibitorio de <i>Chara Braunii</i> Gmelin en el crecimiento poblacional de <i>Microcystis aeruginosa</i>	1
Planteamiento del Problema	6
Pregunta Central de Investigación	6
¿Puede <i>Chara Braunii</i> inhibir el crecimiento poblacional de la cianobacteria <i>Microcystis aeruginosa</i> ?	6
Preguntas Específicas de Investigación	6
Objetivos General.....	7
<i>Objetivos Específicos.</i>	7
Justificación.....	7
Viabilidad.....	8
Evaluación de las Deficiencias en el Conocimiento del Problema	9
Delimitación de la Investigación.....	9
Limitaciones	10
Consecuencias de la Investigación.....	11
Marco Teórico - Teorías sobre inhibición de cianobacterias por macrófitas acuáticas.....	12
Ecología del fitoplancton	14
Influencias de la temperatura	17
Carófitos.....	19
Hipótesis.....	25
Definición Conceptual de las Variables o Constructos	26
Identificación de las Variables o Constructos	26
Definición Operacional de las Variables.....	26
Marco Metodológico	27
Descripción del Lugar de la Investigación.....	27
Enfoque de la Investigación.....	29
Diseño de Investigación	29

Tipo de Investigación	29
Nivel de Conocimiento Esperado.....	29
Población y Muestra.....	30
Instrumentos y Técnicas de Recolección de Datos	30
Muestreos e identificación taxonómica	30
Aislamiento de célula para cultivo.....	32
Recuento de crecimiento.....	33
Análisis de interrelación de especies	34
Composición química de ácidos graso de <i>Chara Braunii</i>	36
Análisis por cromatografía líquida de alta frecuencia (HPLC).	37
Extracción de esencia.....	37
Diseño de fotobiorreactor	37
Prueba de inhibición	38
Diseño experimental	40
Marco Analítico.....	41
Resultados	41
Área de estudio	41
Identificación taxonómica de cianobacteria.....	45
Identificación taxonómica de macrófita.....	49
Análisis de la interrelación entre la especie.....	51
Composición química de ácidos grasos de <i>Chara Braunii</i>	70
Prueba de inhibición	72
Rango de Inhibición.....	75
Análisis de varianza del factor dosificación para Rango inhibitorio como respuesta	82
Discusión de los resultados	86
Conclusiones	97
Recomendaciones	99
Lista de Referencias.....	100
ANEXO	107
Anexo 1	107
Muestreo e identificación y cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i>	107
Anexo II	114
Resultado y prueba de fotobiorreactor	114
Anexo III	115

Muestreo e identificación de <i>Chara Braunii</i>	115
Anexo IV	119
Elaboración de extracto de <i>Chara Braunni</i>	119
Anexo V	122
Prueba de inhibición y conteo de biovolumen por día.....	122
Anexo VI -.....	126
Clave para el género Chara presente en el embalse Tacuary	126
Clave general.	126
Anexo VII -	127
Descripción de Chara braunii.....	127

**Efecto inhibitorio de *Chara Braunii* Gmelin en el crecimiento poblacional de
*Microcystis aeruginosa***

María Victoria López Pereira

Universidad Nacional de Itapúa

María Victoria López Pereira, Escuela de postgrado, Investigadora del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología, Universidad Nacional de Itapúa.

E-mail: vlop.aa@gmail.com

Resumen

Esta investigación tuvo como objetivo analizar los efectos inhibitorios de *Chara Braunii* sobre el crecimiento poblacional de *Microcystis aeruginosa*. Para el logro de los objetivos específicos, 1) se realizaron colectas e identificación taxonómica de las especies, utilizando claves de identificación. Posteriormente, el aislamiento y cultivo de *Microcystis aeruginosa* utilizando 6 biorreactores y medio BG11 en dosificación de 2000 mL, dando como resultado que las condiciones de crecimiento ideales fueron temperatura promedio de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, PAR de 0,8086 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, fotoperiodo de 14:10, pH de 7,10 y agitación diaria. Con los datos de densidad, se aplicó el modelo Lokta-Volterra, los resultados indicaron que las estaciones de primavera y verano, se registró exclusión competitiva de *Microcystis aeruginosa* siendo *Chara Braunii* la de mayor competitividad espacial. 2) Por HPLC se determinaron los ácidos grasos de *Chara Braunii*, siendo los ácidos oleico, linoléico, palmítico y esteárico los de mayor porcentaje. 3) Se realizaron extractos de la macroalga, que fueron aplicadas al cultivo de la cianobacteria en dosificaciones de 3,5, 15 y 20 mL, calculando diariamente la concentración celular y rango inhibitorio. Se aplicó el análisis de varianza y comparación de medias por el método Fisher con lo cual se determinó que hubo una reducción de la concentración celular al 5to día de experimentación y una mayor inhibición de *Microcystis aeruginosa* aplicando la concentración de 20 mL del extracto, infiriendo que los compuestos alelopáticos de *Chara Braunii* podrían ser los ácidos grasos presentes en la planta. Se concluye que a mayor concentración del extracto de la macroalga, esta inhibe a *Microcystis aeruginosa*, siendo posible su aplicación en lagos u embalses que presenten floraciones algales de este tipo.

Palabras clave: Compuestos alelopáticos, carófitos, inhibición, cianobacteria

Abstract

The aim of this research was to analyze the inhibitory effects of *Chara Braunii* on the population growth of *Microcystis aeruginosa*. To carry out the specific objectives, 1) collections and taxonomic identification of the species were carried out, using identification keys. Followed by the isolation and culture of *Microcystis aeruginosa* using 6 bioreactors and half of BG11 in 2000 mL dosage, in which it was observed that the ideal growth conditions were the average temperature of 25 ± 3 ° C, PAR of $0.8086 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, photoperiod of 14:10, pH of 7.10 and daily agitation. As for the density data, the Lotka-Volterra model was applied, the results indicated that during the spring and summer seasons, there was registered competitive exclusion of *Microcystis aeruginosa* being *Chara Braunii*; the one with the highest spatial competitiveness. 2) *Chara Braunii* fatty acids were determined by HPLC, being the oleic, linoleic, palmitic and stearic acids with the highest percentage. 3) Extracts of the macroalgae were carried out, which were applied to the cultivation of the cyanobacterium in dosages of 3.5, 15 and 20 mL, calculating daily the cell concentration and inhibitory range. The analysis of variance and comparison of measures was applied using the Fisher method, with which it was determined that there was a reduction in cell concentration on the 5th day of experimentation and a greater inhibition of *Microcystis aeruginosa* by applying the concentration of 20 mL of the extract, inferring that the allelopathic compounds of *Chara Braunii* could be the fatty acids present in the plant. It is concluded that a higher concentration of macroalgae extract inhibits *Microcystis aeruginosa*, being possible its application in lakes and reservoirs that have algal blooms of this type.

Key words: Allelopathic compounds, charophyta, inhibition, cyanobacteria

Efecto inhibitorio de *Chara Braunii* Gmelin sobre el crecimiento poblacional de *Microcystis aeruginosa*

En los últimos años el Paraguay ha desarrollado serios problemas de floraciones algales en regiones puntuales como el lago Ypacarai, asimismo, en regiones inundadas por efecto de las represas hidroeléctricas, susceptibles de sufrir este tipo de problemas ambientales, producto de una inadecuada gestión ambiental de cuencas hídricas. Este tipo de contaminación del agua representa un dilema en el saneamiento ambiental de los cursos de agua una vez que hayan sido afectados.

A nivel local, luego de realizar la investigación sobre “el fitoplancton del Subembalse Tacuary del Carmen del Paraná en el Departamento de Itapúa” (López Pereira, 2013). A través de métodos de determinación de biovolumen se determinó la existencia de floraciones algales durante las cuatro estaciones del año que han sido investigadas, siendo la especie *Microcystis aureginosa* la que presenta mayor abundancia relativa.

Hallegraeff (1993) sostiene que “se estima que más del 50% de las floraciones de cianobacterias de aguas continentales, registradas a nivel mundial, son tóxicas”, reforzando las investigaciones sobre el tema, Zhang *et.al* (2009) afirma que “*Microcystis aeruginosa* es la especie más común en floraciones algales de cianobacterias en cuerpos de agua eutrofizados y la Microcystina secretada por la mismas es un componente toxico que se ha vuelto peligroso para ambientes acuáticos”.

Esto fortalece la afirmación de que la misma constituirá un problema ambiental y de salud pública de difícil manejo a nivel local, como lo es en el contexto nacional considerando los antecedentes en la Cuenca del Lago Ypacarai. El control o solución a la problemática del crecimiento de cianobacterias tóxicas ha logrado una atención cada vez mayor a nivel nacional e

internacional, debido a que aún no se ha logrado una solución eficiente a la misma.

Considerando lo expuesto, la solución a este tipo de contaminación del agua representa un sesgo dentro de las ciencias ambientales, la factibilidad de aplicación de las técnicas depende en gran medida de la ecología y la vulnerabilidad del ecosistema. Tal como se observó, en las áreas de cobertura de la macroalga *Chara Braunii*, hubo una mayor dilución de las floraciones existentes en el embalse Tacuary durante el año 2013. Así como la no presencia de floraciones algales en puntos específicos donde se encontraban las praderas de la macroalga.

Por ello, el objetivo de la presente investigación, fue experimentar el efecto inhibitorio del extracto de la macroalga *Chara Braunii* en el crecimiento poblacional de la especie *Microcystis aeruginosa* en condiciones de laboratorio, de modo a encontrar la fitoremediación ambiental más factibles para los ecosistemas acuáticos de nuestra localidad. Y cuya aplicabilidad no sea invasiva para el ecosistema y represente un bajo costo y una solución duradera a las floraciones.

Planteamiento del Problema

En el año 2013 se han presentado floraciones algales en el embalse Tacuary ubicado en Carmen del Paraná, Departamento de Itapúa; así como en el lago Ypacarai en el Departamento de Cordillera, cuyo manejo ha significado un desafío sin solución.

Estas floraciones algales tóxicas han comprometido la explotación para riego o recreación del agua de estos cauces hídricos. A través de la observación de campo, se ha constatado que la presencia de la macrófita *Chara Braunii* ha diluido en varias áreas la cobertura de estas floraciones. Ante la problemática que representa, se ha investigado la capacidad de esta macrófita en la inhibición de las floraciones algales. Así como los componentes alelopáticos de la misma, que inhiben el crecimiento de *Microcystis aeruginosa*. Con lo cual se contribuyó al conocimiento de las especies investigadas y una alternativa de manejo a la problemática.

Pregunta Central de Investigación

¿Puede *Chara Braunii* inhibir el crecimiento poblacional de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*?

Preguntas Específicas de Investigación

1. ¿Cuáles son las condiciones adecuadas para el cultivo de la especie *Microcystis aeruginosa* aislada del medio natural?
2. ¿Cuáles son los compuestos químicos específicos de *Chara Braunii* generen la inhibición del crecimiento poblacional de *Microcystis aeruginosa*?
3. ¿Qué dosificación del extracto de *Chara Braunii* podría generar un efecto inhibitorio en el cultivo de *Microcystis aeruginosa*?

Objetivos General

Analizar el efecto inhibitorio del extracto de la *Chara Braunii* sobre el crecimiento poblacional *Microcystis aeruginosa* en condiciones de laboratorio.

Objetivos Específicos.

1. Analizar las condiciones ambientales del crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en cultivo aislado del medio natural
2. Analizar la composición química de ácidos grasos de la macroalga *Chara Braunii*
3. Determinar el efecto inhibitorio del extracto de *Chara Braunii* en diferentes concentraciones sobre un cultivo de *Microcystis aeruginosa*.

Justificación

Las floraciones algales de cianobacterias tóxicas pueden generar impactos ambientales irreversibles en la calidad del agua y la biología del curso hídrico afectado, el paisaje, la estética, la economía y el saneamiento en toda la cuenca hídrica afectada. A nivel internacional, la remediación o solución definitiva a la problemática ha conllevado altos costos de inversión para los municipios afectados. Muchas de las tecnologías empleadas para su solución tienen un corto plazo de eficiencia, debido a que las condiciones ambientales varían y cada ecosistema es diferente.

Tras el desarrollo de una investigación particular a nivel local, se ha determinado la existencia de estas floraciones algales y un alto biovolumen de la especie de cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa* en el subembalse Tacuary del Distrito de Carmen del Paraná, como también se ha observado en campo, una mayor dilución de las floraciones de cianobacterias, en las áreas con presencia de la macroalga *Chara Braunii*

A través del mismo surgió la posibilidad de inhibir el crecimiento de cianobacterias en la masa de agua por medios biológicos que no afecten al ecosistema acuático local, por el contrario, que formen parte del mismo.

Por ello, esta investigación propuso la alternativa de indagar una posible fitorremediación con la utilización del extracto de una macroalga presente en el ecosistema local, para solucionar el problema ambiental de las floraciones de la cianobacteria tóxica presente en el embalse. El cual trata de una tecnología emergente que debe ser considerada para la rehabilitación de sitios contaminados, debido a su rentabilidad, ventajas estéticas y de largo plazo de aplicabilidad.

La investigación adquiere importancia para el país debido a que la problemática relacionada a las floraciones algales es de difícil y costosa solución. Y por la crítica situación ambiental de los recursos hídricos y cuyos efectos impactan directamente sobre las condiciones sanitarias y ambientales de la comunidad.

El logro del objetivo principal generó mayores conocimientos sobre el tema y contribuyó a identificar una alternativa de manejo de una de las especies de microalgas más comunes en floraciones algales tóxicas identificados en nuestro ecosistema local, con una técnica que aún no ha sido investigada en el país y que contribuirá a su conocimiento. El método fue económica y ambientalmente factible debido a que se utilizó una especie de macrófita acuática existentes en el embalse.

Viabilidad

Las condiciones de viabilidad del proyecto son múltiples y entre ellas se pueden citar:

Aptitudes personales: se contó con la competencia técnica y experiencia; así como los conocimientos y las herramientas para realizar las tareas que se propusieron en la investigación.

En cuanto a aspectos institucionales, la Universidad dispone de laboratorios, equipos y biblioteca digital para la adecuada realización de los trabajos experimentales.

Sobre la accesibilidad a los datos de campo, los sitios de muestreo seleccionados fueron públicos y de libre ingreso, por ende, se pudieron realizar los muestreos y análisis en el tiempo estimado.

Por otro lado, por el alto costo de los trabajos realizados en la investigación, se obtuvo la financiación del proyecto por parte del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), con lo cual se cubrieron aspectos financieros de la misma.

Evaluación de las Deficiencias en el Conocimiento del Problema

En un ecosistema la competencia por los nutrientes, la luz o el espacio son factores conocidos, se ha indicado en varias investigaciones la utilidad que tienen las macrófitas para la remediación de diversos tipos de contaminantes. En el caso de la fitorremediación de floraciones algales de cianobacterias, se han implementado especies de macrófitas como los totorales por su capacidad de absorción de nutrientes de la cianobacteria, no obstante, sobre la especie *Chara Braunii* presente en el embalse de estudio en particular, aún no se registran mayores datos sobre las propiedades químicas de la misma que podrían generar esta dilución de las floraciones observadas en el mismo y remediar este tipo de contaminación; así como son desconocidos aspectos sobre la dosificación en la que esta capacidad de inhibición podría llegar a tener efectos y solucionar las floraciones de la especie *Microcystis aeruginosa* en particular por ser identificada como la de mayor biovolumen en el embalse.

Delimitación de la Investigación

Temporal- La investigación se desarrolló durante el periodo anual 2016 a 2018. Tomando como etapa experimental 5 días de observación en laboratorio.

Espacial- Las especies fueron muestreadas de 3 puntos del embalse Tacuary, ubicado en el Distrito de Carmen del Paraná del Departamento de Itapúa (Latitud 27°13'17.84" S- Longitud 56°10'14.51" O)

El espacio de trabajo fue laboratorial, realizándose la experimentación en 6 fotobiorreactores diseñados y construidos para el efecto.

Metodología

La investigación fue cualitativa y experimental debido a que se realizarán trabajos de medición de las variables tomadas por cada objetivo

Su enfoque fue cuantitativo, debido a la metodología se fundamentó en la “construcción y medición de dimensiones, indicadores e índices de variables, y los datos deben responder a estos factores, por lo cual tendrán validez si son verificables o no, lo cual quiere decir que deben ser observados y constatados de alguna forma” (Tamayo y Tamayo, 2008).

El diseño fue de tipo experimental, debido a que se realizó la manipulación de una variable experimental no comprobada, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento en particular (Tamayo y Tamayo, 2008).

Instrumento de recolección de dato: observación directa, análisis de contenido cualitativo, tabulación, cálculo y anotaciones o notas de campo (Hernández Sampieri, Fernández Collado, & Baptista, 2010).

Limitaciones

Las limitaciones del presente trabajo son generalmente de orden técnico, sobretodo accesibilidad a equipos para el mantenimiento del cultivo de la cianobacteria y análisis correspondiente.

Consecuencias de la Investigación

Los resultados exitosos de la investigación servirán a la comunidad, no solo a nivel local sino a nivel país, como una alternativa para solucionar una problemática ambiental referente a floraciones algales con características tóxicas.

Marco Teórico - Teorías sobre inhibición de cianobacterias por macrófitas acuáticas

Tras años de revisión de datos de investigaciones sobre la línea, se destaca que la alelopatía de las macrófitas acuáticas ha recibido especial atención como potenciales medios de control de floraciones algales en países orientales y europeos. Sobre todo, para reducirlos en lagos eutróficos poco profundos (Pakdel, Sim, Beardall, & Davis, 2013). Siendo la eutrofización un grave problema que afecta a los sistemas acuáticas en el mundo. Sin embargo, se han hallado reducidos casos de estudios de alelopatía o efecto inhibitorio a nivel regional.

La presencia de las macrófitas sumergidas se considera que es de gran importancia para mantener el estado de las aguas claras de los lagos poco profundos. Fijan cantidades sustanciales de nutrientes en su biomasa y por lo tanto compiten por estos nutrientes con “otros organismos autótrofos, tales como fitoplancton, y limitar el crecimiento de este último por la exudación de sustancias alelopática que inhiben el crecimiento de los mismos” citado por (Mulderij G. a, Mooij, Smolders, & Van Donka, 2005).

Por ello, la alelopatía de algunas especies de macrófitas acuáticas puede ser una estrategia útil el control de floraciones algales. A nivel mundial se han realizado investigaciones experimentales de coexistencia entre plantas y fitoplancton, sean cianobacterias, clorófitas y diatomeas. Así como pruebas de extractos de las mismas en el caso de *Chara globularis*, *Chara vulgaris* y *Chara áspera*, principalmente (Wium-Andersen et al, 1982; Blindow y Hootsmans, 1991; Mulderij et al, 2005, Zhang et al. 2009, Pakdel et.al. 2013), “*Ceratophyllum*” (Jasser, 1995; Mjelde y Faafeng, 1997) y “*Myriophyllum*” (Jasser, 1995; Gross et al, 1996), “*Egeria densa*” (Amorim, 2017) “lo que resulta en cambios en la biomasa de fitoplancton, la composición del fitoplancton o ambos” (Mulderij et al. 2005; Hilt&Bakker, 2016). Los

aleloquímicos o sustancias alelopáticas son metabolitos secundarios generados y liberados por las plantas, estos le proporcionan beneficios competitivos como lo son provocar efectos negativos hacia el fitoplancton, animales (Meerhoff & Mazzeo, 2004) y hasta sobre otras plantas. Varios son los estudios realizados sobre las interacciones alelopáticas entre el fitoplancton y macrófitas (Nakai *et al.*, 1999; Körner & Nicklisch, 2002; Mulderij *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 2007), pero aún el conocimiento sobre los efectos antagonistas de estas dos comunidades es escaso.

En las interacciones alelopáticas, macrófitas y fitoplancton liberan sustancias químicas a la columna de agua, estas especies se ven directa y/o indirectamente afectadas (principalmente negativamente) por dichos compuestos reduciendo su crecimiento, concentración de clorofila y capacidad fotosintética (Jang, Ha, & Takamura, 2007). Según Monteiro (2016) la relación cianobacterias/macrófitas se dio de tal forma que cuanto menor el biovolumen algal, mayor es la biomasa vegetal y concentración de toxina, así, las macrófitas inhiben el desarrollo del fitoplancton, sin embargo, estimula el proceso de liberación de toxina.

En pruebas de coexistencia entre macrófitas y cianobacterias, Körner & Nicklisch (2002), hallaron que la inhibición de *M. aeruginosa* por parte *Myriophyllum spicatum* depende de la biomasa de la macrófita. De igual manera, según Hilt *et al.* (2012), en pruebas con otra especie de algas (*Desmodesmus subspicatum*) incubadas en tubos de membrana de diálisis en acuarios mostraron una fuerte disminución en todos los parámetros bajo la influencia de *Myriophyllum verticillatum*, demostrando la alelopatía de esta especie. Zhang *et al.* (2009) destaca que los ácidos grasos presentes en *Chara vulgaris*, principalmente el ácido ortodecanoico, tetradecanoico y hexadecanoico inhiben el crecimiento de *M. aeruginosa*, siendo más potente el ácido ortodecanoico.

Según Berger & Schagerl (2004), compuestos implicados en los procesos alelopáticos son metabolitos secundarios, subproductos de vías metabólicas con diversas estructuras químicas y fuerte bioactividad, así también se han hallado compuestos alelopáticos como los polifenoles o metabolitos secundarios en *Myriophyllum spicatum* o *Ceratophyllum demersum*.

En el caso de los carófitos se ha hallado que los extractos de *Chara aspera*, *Chara globularis*, *Nitellopsis obtusa* y *Nitella gracilis* han demostrado tener inhibición del crecimiento de las cianobacterias *Anabaena cylindrica* y *A. torulosa*. En el caso de la especie *Chara Braunii* se ha analizado su bioactividad en la inhibición del crecimiento de hongos (Khalid & Riaz, 2015). Por ello, se observó que la inhibición va a depender del grupo y especie de cianobacteria como de macrófita a la que estas dos comunidades estén expuestas tanto en el medio natural como a nivel experimental (Körner & Nicklisch, 2002).

La importancia de estos efectos aparece como una contribución a ampliar el escaso conocimiento que se tiene de las interacciones plantas-cianobacterias y evaluar futuras aplicaciones en manejos de restauración de sistemas (sub)tropicales degradados (Bonilla, 2009).

Ecología del fitoplancton

Las Cianobacterias, denominadas también Cianofíceas o algas verde-azuladas en el ámbito botánico, incluyen aproximadamente 150 géneros que engloban unas 2000 especies. Son organismos procariotas, aeróbicos y fotoautótrofos, por tanto, utilizan la fotosíntesis como mecanismo principal para obtener energía. “Su ciclo vital sólo requiere agua, CO₂, sustancias inorgánicas y luz, lo que les permite crecer en medios muy simples” (Forján *et al.*, 2008, Mur *et al.*, 1999 citado por Cobo *et al.* 2012).

Contribuyen significativamente a la producción primaria acuática, ocupando un papel central en el plancton junto con microalgas eucariotas. Sin embargo, las cianobacterias planctónicas, también son un tema de preocupación para calidad del agua y la salud humana, especialmente en los ecosistemas límnicos, ya que pueden crecer masivamente (floraciones) y producir peligrosas toxinas para el ser humano (Bonilla, Kruk, De León, Vidal, & Brena, 2009).

Desde sus orígenes hasta el presente, las cianobacterias han colonizado con éxito diversos tipos de ecosistemas. La mayor parte de las especies son de vida libre y se encuentran, principalmente en ecosistemas acuáticos (marinos y continentales), pero también pueden encontrarse en ecosistemas semi-acuáticos o terrestres (Bonilla, 2009).

Desde el punto de vista genético son muy parecidas a las bacterias Gram negativas, pero muestran características propias, como la presencia de clorofila-a, la facultad de utilizar el agua como dador de electrones en la fotosíntesis y la capacidad enzimática para una fotosíntesis aerobia oxigénica (Cobo, Lagos, Barca, Vieira, & Servia, 2012)

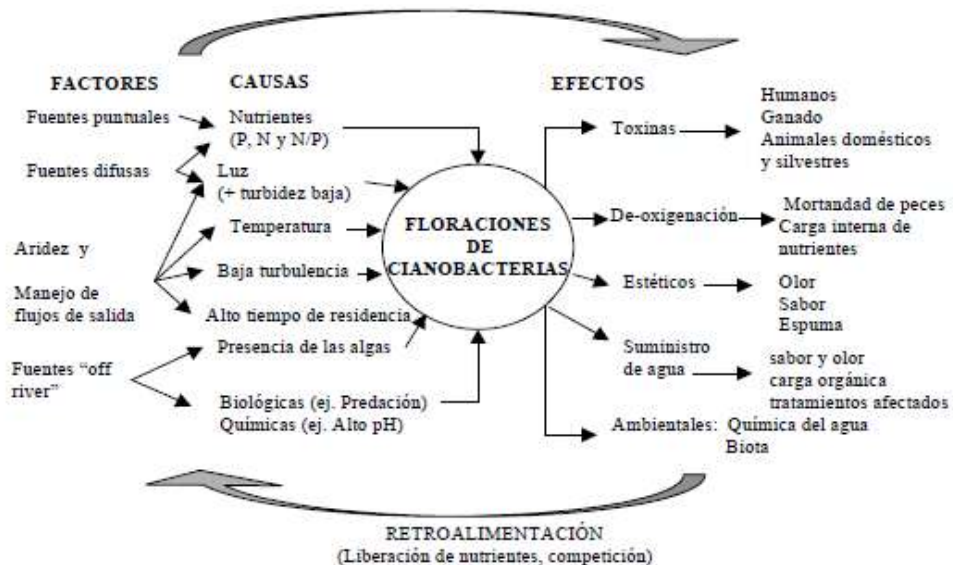
Su particularidad deriva en que las cianobacterias son estructuralmente semejantes a las bacterias pero realizan fotosíntesis como las algas.

Se supone que fueron los primeros productores de materia orgánica que liberaron oxígeno a la atmósfera primitiva y son, probablemente, responsables de la mayor transformación evolutiva que conduce al desarrollo del metabolismo aeróbico necesario para la posterior aparición de las plantas superiores y animales (Fray, 1983 citado por Cobo et al. 2012).

El crecimiento de las cianobacterias fitoplanctónicas en los ambientes naturales depende de su capacidad de optimizar la utilización de los recursos y minimizar las pérdidas de biomasa. Los recursos necesarios para el crecimiento son la luz y los nutrientes

(minerales), mientras que las pérdidas se deben a la depredación, sedimentación hacia zonas afólicas (oscuras) donde no es posible realizar la fotosíntesis y el “lavado” por el arrastre de las corrientes de agua. Las interacciones tróficas entre los organismos en los cuerpos de agua también juegan un papel importante para determinar la dominancia o no de las cianobacterias (Bonilla, 2009).

Ilustración 1 Diagrama simplificado de causas que determinan las floraciones de cianobacterias en sistemas acuáticos



Fuente: (De León, 2002)

Características morfológicas de *Microcystis aeruginosa*

La especie *M. aeruginosa* es una cianobacteria del orden Chroococcal que forma colonias irregulares que pueden medir 352 µm en promedio de largo (min: 55,0; máx: 650) y 402 µm de ancho (min: 55,0; máx: 725). Las células son esféricas a hemiesféricas, de tamaños promedio de 4,9 µm (min: 3,0; máx: 7,0), luego de la división celular. (Komárek y Anagnostidis, 1999).

Colonias lobadas, globosas y generalmente clatradas, mucílago difuso y transparente que sobrepasa ampliamente el límite de las células. Células esféricas y oscuras, debido a la gran

densidad de aerótopos, concentradas en el centro de las colonias (Sant Anna, 2006; Bonilla et al., 2009; López Pereira, 2018).

Influencias de la temperatura

El balance entre la dominancia por macrófitas sumergidos o las cianobacterias es sensible a la temperatura y tiene fuertes efectos positivos en la reducción como inhibición de las floraciones de cianobacterias (Bakker & Hilt, 2016).

Han tenido mucho éxito en la colonización de ecosistemas tanto terrestres como acuáticos, principalmente estos últimos. Pueden vivir en condiciones extremas, desde aguas termales a 75 °C hasta lagos antárticos con temperaturas próximas a los 0°C (Cobos et.al. 2012). Los blooms de Cianobacterias aparecen generalmente al final del verano, septiembre y octubre, en períodos de horas a días (Cobo et. al 2012).

Según Forján *et.al* (2008), Un aumento en la concentración de nutrientes, junto a factores coadyuvantes como elevadas temperatura e intensidad de luz, entre otros, pueden originar un desarrollo explosivo de cianobacterias. La temperatura óptima para el desarrollo de estos blooms es de, aproximadamente, 25°C, lo que permite que en climas templados se den con mayor frecuencia a finales de primavera, verano y principios del otoño.

En algunas situaciones, las cianobacterias tienen la facultad de dominar el fitoplancton gracias a su capacidad para explotar intensidades de luz muy bajas o altas, optimizar la fotosíntesis mediante la flotación en la columna de agua, soportar amplios rangos de temperatura, crecer en ambientes crónicamente deficientes en nutrientes y resistir la depredación debido a su capacidad de sintetizar toxinas y a su plasticidad morfológica (Bonilla et.al. 2009).

De igual manera, Cobo et al. (2012) y Gianuzzi et al. (2016) indican que son especialmente euritéricas, determinando que sus óptimos de temperaturas van de 20 a 30 °C.

Así también, la estratificación térmica dependiente de factores climáticos como viento y temperatura del aire (condiciones estacionales del año) determinan el gradiente de distribución del fitoplancton en la columna de agua.

Microcystis aeruginosa posee la capacidad de situarse en un lugar propicio para la supervivencia y el crecimiento mediante sus vesículas de gas, obteniendo nutrientes “en las zonas profundas de la columna de agua o energía fotosintética en la superficie de ésta, siendo la temperatura un estímulo ambiental fundamental” (WALSBY, 1987; MUR *et al.*; 1999 citado por Cobo et.al 2009).

Suzuki (2011) citado por Lizarralde Oliver (2014) resalta que un incremento de la floraciones de cianobacterias en muchos ecosistemas continentales alrededor del mundo están asociadas a variaciones climáticas, dentro de ellas se resalta el calentamiento global.

Así también la temperatura es uno de los factores preponderantes para el crecimiento de las cianobacterias en corto tiempo:

El rango de temperatura a la que generalmente se produce la tasa máxima de crecimiento se encuentra entre 25 y 30 °C, según resultados experimentales con cultivos de cianobacterias (Reynolds, 2006). Entre el 0 °C y el valor óptimo para cada organismo, se produce un incremento de la tasa de crecimiento en función de la temperatura. Por encima del rango de temperatura óptima ocurre una disminución abrupta de la tasa de crecimiento. Generalmente se considera que las cianobacterias prefieren temperaturas más altas que las algas eucariotas (Dokulil & Teubner 2000 citado por Bonilla *et.al.* 2008).

Según Domis et.al. (2007) El calentamiento global podría favorecer el crecimiento de las cianobacterias sobre las diatomeas, y en menor medida, las algas verdes.

En el contexto del cambio climático, el aumento de la temperatura y los cambios en los patrones de precipitación pueden tener efectos sinérgicos significativos sobre los procesos de eutrofización en los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, las evidencias no son definitivas, y mientras algunos estudios reportan un posible aumento de la biomasa algal como consecuencia del aumento de la temperatura (Jeppesen, Sondegaard, & Jensen, 2003).

Aunque no es aún claro cómo “el fitoplancton responderá globalmente al aumento de la temperatura, resulta evidente que una posible consecuencia es la disminución de los tiempos de generación de las especies, propiciando así la selección de las formas mejor adaptadas a las nuevas condiciones ambientales” (Domis et al. 2007).

Pero es evidente que factores como la intensidad lumínica, el viento y la temperatura influyen en su crecimiento.

Las alteraciones en pocos grados de la temperatura de los cauces hídricos pueden acarrear también importantes alteraciones tróficas. Mendoza et.al (2014) sostiene que:

Son varias las causas de los florecimientos, pero entre las principales se encuentran el aporte de nitratos y fosfatos abundantes en las surgencias en las costas y por las escorrentías con residuos de fertilizantes agrícolas, y el aumento en la temperatura del agua a raíz del cambio climático.

Carófitos

Los carófitos son un grupo de macrófitos acuáticos sumergidos, pertenecientes a la división Chlorophyta, algas verdes que al quedar en contacto con el aire se secan y

mueren. Los hay de muy diferentes tamaños, desde bastante pequeños (3–10 cm), que viven en ambientes estacionales y aguas someras (*Nitella confervacea*, *Tolypella salina*), hasta los que pueden considerarse grandes (100-180 cm), que colonizan enclaves por lo general permanentes donde pueden superar los 20 m de profundidad (*Chara hispida var. major*) (Cirujano et al., 2008).

“Viven en ambientes muy diferentes con distintos tipos de aguas, desde las casi puras, oligohalinas y oligótroficas” (Cirujano, Cambra, Sánchez Castillo, Meco, & Flor Arnau, 2008). Kufel & Ozimek (1994) y Scheffer (1998) enfatizaron “el importante papel que tienen en establecer y mantener un estado estable dominado por macrófitos acuáticos, restringiendo la abundancia de fitoplancton”. Además, “los carófitos, debido a que su presencia se mantiene durante la mayor parte del año, sobre todo en los ecosistemas de aguas permanentes, tienen efectos positivos sobre las comunidades de peces” (Scheffer, 1998; Wetzel, 2001), así como de aves e invertebrados. Considerando que este factor lo hace vulnerable a la posibilidad de periodos con elevada precipitación en las que normalmente se reducen sus colonias, sobretodo, en sistemas como el embalse Tacuary de la localidad de Carmen del Paraná.

En relación al hábitat de la especie *Chara braunii*, específicamente según Mormul *et.al.* 2010; Meuer & Bueno, 2012, fueron identificados en el embalse Itaipú, siendo su hábitat principal embalse y lagos de poca profundidad, conforme a Cirujano *et.al.* 2008, están presentes en aguas dulces o ligeramente salinas, frecuente en arrozales, y la presencia de praderas de carófitos suele ser un indicador de la buena calidad ambiental de los ecosistema acuáticos. Parece que algunas poblaciones actuales han prosperado a partir de introducciones ligadas al cultivo del arroz. Características presentadas por los puntos de muestreo, debido a que el embalse

Tacuary representa cultivos de arroz inundados por la represa Yacyretá; y actualmente recibe efluentes de industrias arroceras.

Cuando hablamos de factores ambientales que determinan la distribución de las macrófitas acuáticas existen varias teorías. Según Spence (1982) “Los factores potencialmente determinantes y que están relacionados con la profundidad son la presión hidrostática, la irradiancia y la temperatura. La presión hidrostática fue considerada primordial” ya por Schimper (1854), sin embargo, Spence (1982), por contra, “no atribuye ningún papel significativo a la presión, considerando únicamente a la irradiancia como determinante de la distribución”. Varios autores hallaron que independientemente de la presión condiciones como la luz y la temperatura eran preponderantes para el crecimiento apical de las carofíceas.

Cirujano et.al. (2008) refiere que:

Los carófitos en general, los carófitos que viven en aguas dulces y poco mineralizadas no tienen sus ejes y ramificaciones incrustados de sales, pero los que viven en aguas mineralizadas, especialmente en aguas alcalinas ricas en bicarbonatos, suelen estar cubiertos de incrustaciones. Al quedar en contacto con el aire se secan y el suelo queda cubierto por sus restos blanquecinos.

Hay otros factores como el tipo de sustrato, la concentración de nutrientes, las fuentes de carbono, el oxígeno, la tasa de sedimentación, etc. que son importantes en la distribución, pero no de manera general como los tres anteriores: presión, luz y temperatura (Peñuelas, 1987). Así también, según Ramos Montaña *et.al* (2013):

La distribución de las macrófitas acuáticas depende de factores como la topografía, la geología y el clima, además de eficaces mecanismos para dispersar sus semillas o propágulos; el éxito de dispersión a grandes distancias en las plantas acuáticas ha sido

facilitado por tolerancias ecológicas y la plasticidad a diferentes condiciones; el establecimiento se atribuye en gran parte al crecimiento clonal y la abundancia de rizomas, lo que favorece la colonización a través de la dispersión por el agua, el viento, la actividad humana y la migración de aves.

Tanto el pH como la conductividad y la penetración de la luz en la columna de agua hacen posible la presencia de carófitos dadas las condiciones en este embalse. Esto se ve reflejado en la presencia y crecimiento de carófitas en los embalses de Itapúa, sobretodo en el embalse Tacuary, donde inicia su florescencia en los primeros días de la estación primaveral y alcanza su pleno desarrollo en los en todo el periodo de verano, alcanzo extensas colonias con una cobertura total del área en la zona litoral de los mismos (López Pereira, 2013).

Ilustración 2 Distribución de Chara Braunii Gmelin en embalse Tacuary, Itapúa, periodo-Primavera, 2016



Fuente: Elaboración propia. Fecha: 10-10-17

Cuando nos referimos a factores que limitan la presencia de carófitos, Cirujano *et.al.* (2005) refiere que la “eutrofización limita y reduce la abundancia de los carófitos en los lagos y humedales”. Se ha analizado que un aumento de la temperatura máxima media registrada en

Paraguay (DINAC, 2016) puede contribuir a la aceleración de la eutrofización en ecosistemas acuáticos con alta carga de nutrientes en nuestro país.

Según Calero *et al.* (2015), las actividades antropogénicas amenazan a las plantas acuáticas sumergidas a través de factores como la eutrofización, invasiones biológicas, destrucción del hábitat. Entre estas transformaciones se incluyen al cambio climático, factor que influiría negativamente sobre las macrófitas acuáticas.

El incremento de nutrientes disueltos en el agua tiene inicialmente un efecto positivo sobre la biomasa producida por los carófitos, como ocurre con otras plantas acuáticas, especialmente en los ecosistemas oligotróficos, ya que un aumento inicial moderado de fósforo, en sí mismo, contribuye a un mayor crecimiento de las ovas (Cirujano *et.al.* 2005).

Por el contrario, Álvarez Cobelas *et.al* (1991) refiere que:

Los carófitos se extinguen debido a los efectos inducidos por este exceso de nutrientes y de fósforo: desarrollo incontrolado del fitoplancton, aumento de la turbiedad del agua, escasez de oxígeno, sedimentación de restos orgánicos sobre las ramificaciones de los carófitos que están suspendidos en el agua, desarrollo excesivo de algas filamentosas, entre otros factores.

Otro factor indeseable para el correcto desarrollo de los carófitos son los herbicidas agrícolas que, disueltos en el agua de lluvia, terminan por concentrarse en las depresiones inundadas, por ende, las precipitaciones influyen en las mismas.

Por medio de observaciones en campo se puede determinar que el viento y la precipitación tienen influencia en la distribución y desarrollo de carófitos, particularmente en el embalse Tacuary. Donde se registró una menor área de cobertura luego de temporadas de lluvia y

viento, factores climáticas de gran influencia en el cuenca del Tacuary, por la geomorfología del cauce.

Hipótesis

H1 La disminución del crecimiento poblacional del cultivo de *Microcystis aeruginosa* se debe a la actividad alelopática de los ácidos grasos de *Chara Braunii* **Gmelin** en determinada concentración.

Definición Conceptual de las Variables o Constructos

Identificación de las Variables o Constructos

Las variables independientes son el medio de cultivo, la concentración del extracto de *Chara Braunii*, la temperatura; y la variable dependiente es crecimiento de la población de *Microcystis aeruginosa*.

Definición Operacional de las Variables

Tabla 1 Operacionalización de variables

Variabes	Dimensiones	Indicadores	Instrumento
Medio de cultivo/nutrientes para cultivo	porcentaje de nutrientes utilizados	Aumento de población de cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i>	Observación directa
Concentración de extracto de <i>Chara Braunii</i>	concentración máxima o mínima del extracto	Disminución de población de <i>Microcystis aeruginosa</i> .	Observación directa
Aumento o disminución de la temperatura	aumento o reducción de biomasa del cultivo	Tasa de crecimiento del cultivo	Observación directa medición

Marco Metodológico

Descripción del Lugar de la Investigación

Las especies *Microcystis aeruginosa* y *Chara Braunii* fueron colectadas durante muestreos cuali-cuantitativos estacionales de los periodos 2016-2018, en tres puntos de la margen izquierda del embalse Tacuary localizado en el Distrito de Carmen del Paraná, Departamento de Itapúa (Latitud 27°13'18.49'' S-Longitud 56°10'15.40'' O). Este cauce hídrico está ubicado en zona rural siendo anteriormente áreas de cultivo de arroz y bosques anegados por la represa Yacyretá. Actualmente recibe aportes de efluentes de industrias de producción porcina y arroceras del distrito a través de los arroyos que conforman la cuenca. Cuenta con una extensión de 1029.88 km². Las áreas de muestreo tienen una profundidad media de 2,5 m en la zona litoral y entre 3 a 8 m en la zona limnética. Las características fisicoquímicas anuales en los puntos de muestreo del embalse indican que presenta buena oxigenación con un promedio anual 8,5 mgO/l, 78,7 µS/cm de conductividad, 42,6 mg/L de sólidos totales disueltos, 29,9 mg/L de DQO, 7,03 pH, 0,57 m de transparencia Secchi (López Pereira, 2014). Los antecedentes del embalse Tacuary con base en los niveles de fósforo y clorofila 'a' indican que su estado trófico presenta una condición mesotrófica, con ligera tendencia a Eutrofia (EBY, 1er. Informe semestral de calidad del agua de Sub-embalse de margen derecha, 2014)

Asimismo, los cultivos de *Microcystis aeruginosa* aislados del embalse fueron realizados bajo condiciones controladas en el Laboratorio del agua de la Universidad Nacional de Itapúa, utilizando 6 fotobiorreactores con medio BG11 en dosificación de 2000 mL, temperatura promedio de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, la cual representó la temperatura ambiente no siendo manipulada a nivel laboratorial, PAR de $0,8086 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, fotoperiodo de 14:10, pH de 7,10 y agitación diaria.

Toma de muestras

El material fitoplanctónico colectado de forma directa y con red de 125 micras, fue preservado en botellas de plástico de 500 ml, con agua del embalse las cuales fueron acondicionadas para su transporte al Laboratorio del agua de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional de Itapúa.

Para el muestreo de *Chara Braunii* se utilizó el protocolo de Cirujano et al. (2008), utilizando un rastrillo de fondo con el cual se colectaron plantas maduras incluidos sus rizoides y fueron guardadas con agua del embalse en bolsas de plástico etiquetándose la profundidad del punto, la conductividad y tipo de agua para su transporte al laboratorio de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional de Itapúa.

Tabla 2 Sitio y fechas de muestreo y coordenadas geográficas

<i>Especie</i>	<i>Sitio</i>	<i>Fecha de colecta</i>	<i>Coordenadas geográficas</i>
<i>Chara Braunii</i>	Embalse Tacuary	Febrero-Marzo-Mayo-	27°13'17.84'' S 56°10'14.51''O
		Julio-Setiembre-	27°13'14.43'' S 56°09'37.60''O
		Noviembre-2016-2017	27° 12'57.43'' S 56°09'04.83''O
		Enero-Febrero-Marzo-2018	
<i>Microcystis</i>	Embalse Tacuary		
<i>aeruginosa</i>	Playa la Rotonda,	Enero-Febrero-	25°18'52.76'' S, 57°17'42.74''O
	Lago Ypacarai	Noviembre-2017	

Fuente. Elaboración propia

Enfoque de la Investigación

“El enfoque fue cuantitativo, debido a la metodología se fundamenta en la construcción y medición de dimensiones, indicadores e índices de variables, y los datos deben responder a estos factores, por lo cual tendrán validez si son verificables o no, lo cual quiere decir que deben ser observados y constatados de alguna forma” (Tamayo y Tamayo, 2008).

Diseño de Investigación

Se realizó una investigación experimental en fotobiorreactores, utilizando cultivos axénicos de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, aislados del medio natural.

A los mismos se aplicó el extracto de la macroalga *Chara Braunii* en diferentes concentraciones y en condiciones ambientales controladas y se realizó el cálculo de densidad, medición de pH, temperatura y oxigenación diariamente por un periodo de 5 días. Según Hernández Sampieri (2010), “los experimentos manipulan tratamientos, estímulos, influencias o intervenciones (denominadas variables independientes) para observar sus efectos sobre otras variables (las dependientes) en una situación de control”.

Tipo de Investigación

La investigación fue de tipo experimento puro porque, según Hernández Sampieri (2010), “estos diseños llegan a incluir una o más variables independientes y una o más dependientes. También pueden utilizar prepruebas y pospruebas para analizar la evolución de los grupos antes y después del tratamiento experimento”.

Nivel de Conocimiento Esperado

La investigación tuvo bases exploratorias, debido a que no se cuenta con información validada sobre el tema analizado en las condiciones planteadas. Al lograr los objetivos se obtuvo mayor conocimiento sobre el efecto inhibitorio de la especie analizada sobre la cianobacteria

tóxica presente en las floraciones algales a nivel país, de manera a utilizar como herramienta de gestión sostenible para el problema ambiental.

Población y Muestra

Universo: cianobacterias y macroalgas de subembalses de Itapúa

Población: *Microcystis aeruginosa* y *Chara Braunii* de los subembalses de Itapúa

Muestra: cultivo de *Microcystis aeruginosa* y Concentraciones de extracto de *Chara Braunii*.

Instrumentos y Técnicas de Recolección de Datos

Para la investigación se ha empleado la ficha de trabajo que permitió el ordenamiento y clasificación de los datos generados, la observación directa y medición; y para su procesamiento la tabulación, estadística, análisis e interpretación de los resultados.

Muestreos e identificación taxonómica

Se realizaron 20 campañas de muestreo de cianobacterias abarcando los periodos 2017-2018, durante las cuatro estaciones anuales. Las mismas fueron en la Playa la Rotonda localizada en la cuenca del Lago Ypacarai (25°18'52.76'' S, 57°17'42.74'' O), la laguna Itá (25°30'29.18'' S, 57°21'52.21'' O) localizado en el Departamento de Cordillera y el embalse Tacuary del Distrito de Carmen del Paraná, Departamento de Itapúa (Ilustración 5), para la identificación y cultivo se utilizó el material colectado del embalse.

La identificación morfológica de la célula de *Microcystis aeruginosa* fue realizada con la colaboración de la bióloga y experta en taxonomía y ecología de microalgas y cianobacterias, Dra. Célia Sant Anna de la Universidad de São Paulo Brasil; durante el curso de cianobacterias planctónicas desarrollada en la Universidad de la República del Uruguay en el periodo 2017, y posterior seguimiento en el 2018. (Anexo I)

Se ha utilizado un microscopio óptico (AXL-Labovision-Eglas) a resolución de 40x y 100x (10 μm), la guía taxonómica escrita por Komárek y Anagnostidis (1999) y el manual ilustrado de identificación de cianobacterias escrita por (Sant'Anna, 2006).

Así también, se realizaron cuatro colectas de carófitos del embalse Tacuary, totalizando 60 kilogramos de la macrófita acuática para su identificación y posterior elaboración del extracto.

El procesamiento del material para su identificación taxonómica y posterior depósito en el herbario FCQ de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción ; fue realizada siguiendo los métodos descritos por Cirujano *et.al.* 2008, Bicudo & Menezes (2006), Bicudo (1974), Bicudo & Bueno (2013), Meurer & Bueno (2012), Cascante (2008) y utilizando la clave taxonómica de Cirujano *et al.* 2008, debido a que para la misma se realizaron comparaciones con otras especies. Las medidas fueron tomadas en centímetros y micrómetros conforme a lo indicado por Bicudo (1974). Confeccionándose la ficha del ejemplar de referencia (Tabla 3) Se ha contado con la colaboración del Dr. Santos, Cirujano Bracamontes del Real Jardín Botánico de Madrid para la identificación. (Anexo III-Anexo VI).

Tabla 3 Ficha del ejemplar de referencia

Especie: <i>Chara braunii</i> C.C.Gmelin
Familia: Characeae
Nombre común: No aplica
Colector: Victoria López Pereira
Fecha de colecta: 25-09-2018
Coordenadas: 27°13'17.84'' S-56°10'14.51''O
Sitio: embalse Tacuary, Carmen del Paraná, Itapúa
Hábitat: lagos someros con profundidad de entre 1,00 a 2,00, y conductividad anual promedio de 78,7 μ S/cm y temperatura promedio anual de 22 °C. Campos de cultivo de arroz inundados
Número de colecta: 4

Aislamiento de célula para cultivo

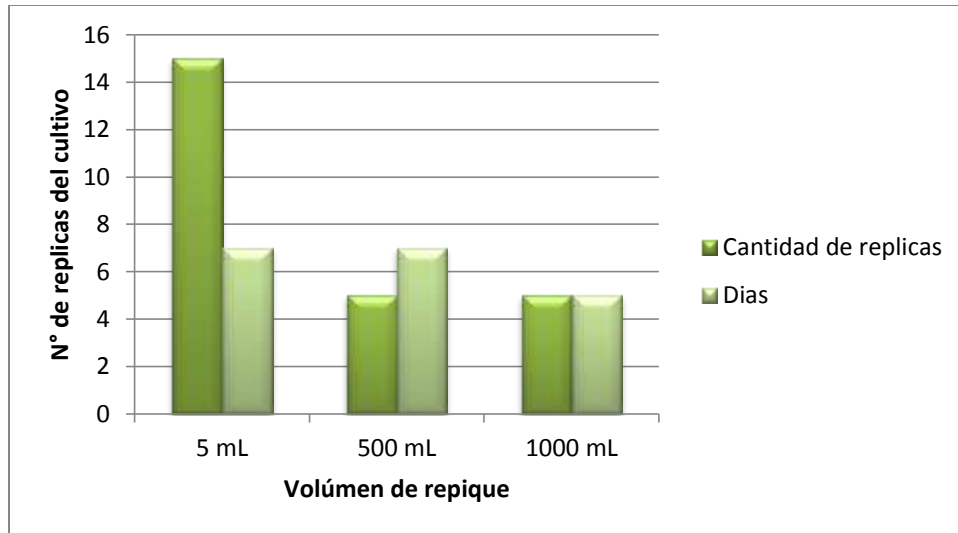
Para el aislamiento de la *Microcystis aeruginosa* se utilizó el método de la pipeta y diluciones sucesivas, para separar formas coloniales o filamentosas (Andersen y Kawachi, 2005), siguiendo el protocolo de aislamiento de Jacinavicius *et al.* (2013).

Se colocaron las muestras en Erlenmeyer de 500 ml, de las cuales se tomó 1 alícuota de 1 ml del material el cual fue puesto sobre un portaobjeto para su observación en el microscopio óptico, donde una vez identificada la célula de *Microcystis aeruginosa* fue aislada por capilaridad para su colocación en cajas de Petri con 1 ml de agua destilada, para el triple lavado del material contaminante.

Las células aisladas fueron colocadas en tubos de ensayo inoculadas con 5 ml del medio de cultivo BG11 (Rippka *et al.* 1979). Se realizaron 15 réplicas durante siete días y

posteriormente se realizó su repique a 500 ml. por 5 días, y sucesivamente a 1000 ml (Figura 2-Anexo I)

Gráfico 1 Secuencia de repique de cultivo aislado



Fuente. Elaboración propia.

Recuento de crecimiento

Para la estimación del crecimiento celular se ha tomado 1 ml del cultivo de 1000 ml, realizándose el recuento celular en cámara Neubauer por el periodo de cinco días siguiendo el protocolo de recuento (Arredondo y Voltolina, 2007), utilizando la fórmula:

Concentración celular: $N \times 10000 / N^\circ$ de cuadros; **(Ecuación 1) (Anexo V)**

Dónde: N es el número de células contadas en los cuatro cuadros grandes

La curva de crecimiento se obtuvo a partir del cálculo del logaritmo natural de la densidad celular obtenida (Tortora *et.al.* 2007)

La tasa de crecimiento (**días⁻¹**), se ha calculado utilizando la siguiente fórmula (Guillard, 1973)

$$\mu = \ln (X_2 / X_1) / (t_2 - t_1) \text{ (Ecuación 2)}$$

En dónde:

μ es la tasa de crecimiento x_0 y x_1 es la concentración celular inicial y final, t_0 y t_1 el tiempo inicial y final

Tiempo de duplicación

$$t_g = \ln 2 / \mu_e = 0.693 / \mu_e \text{ (Ecuación 3)}$$

Análisis de interrelación de especies

De manera a reforzar la investigación sobre el efecto inhibitorio, se realizó un análisis de interrelación entre *Microcystis aeruginosa* y *Chara Braunii*, aplicando el índice de abundancia relativa (IAR). De cada muestra se extrajo una sub muestra analizando la alícuota (gota de agua), contando: 18 gotas de muestra (obtenidas) 1 ml

1 gota de muestra X

$$X = 0.06 \text{ ml (Ecuación 4)}$$

Posteriormente se realizó el siguiente cálculo para determinar el número de células por ml de muestra:

N° Células 0.06 ml

$$X \text{ Células 1 ml (Ecuación 5)}$$

Los resultados del recuento se expresaron en número de células por un mililitro (ml), y son expresados en el Índice de abundancia relativa (Tabla3) donde se identificaron las especies nocivas y el índice de floraciones algales predominantes (Cassis, Muñoz, & Avaria, 2002).

Para la densidad de *Microcystis aeruginosa*, los resultados de cel/mL fueron calculados en porcentajes.

La densidad de *Chara Braunii* se estimó como n° de plantas/ind/m² de una parcela de 1x1m.

Para lo cual se extrajo porcentaje de cobertura conforme al método de Braun Blanquet (Tabla4) (Braun-Blanquet, 1932).

Tabla 4 Índice de abundancia relativa aplicado a *Microcystis aeruginosa* en el embalse

Tacuary, Paraguay

Escala Numérica	Número de individuos	Denominación
0	0	Ausente
1	1	raro
2	2-10	escaso
3	11-50	abundante
4	51-80	Muy abundante
5	80+	Floración

Tabla 5 Índice de Braun Blanquet aplicado a *Chara Braunii* para determinar escala de cobertura en el embalse Tacuary, Paraguay

Valor	Braun Blanquet
+	Menos de 1%
1	1-5%
2	6-25 %
3	26-50%
4	51-75%
5	76-100%

A los resultados de densidades obtenidos en los tres puntos de muestreo fue aplicado el modelo de competición de Lokta Volterra, utilizando el software Populus all 5.5 (Alsdar, 2001).

Aplicando la Ecuación 6:

$$\frac{dN_1}{dt} = r_1 N_1 \left| \frac{K_1 - (N_1 + \alpha N_2)}{K_1} \right|$$

$$\frac{dN_2}{dt} = r_2 N_2 \left| \frac{K_2 - (N_2 + \beta N_1)}{K_2} \right|$$

Dónde: N_1 : representa la densidad de la especie 1 (*Chara Braunii*) N_2 : representa a la especie 2 (*Microcystis aeruginosa*) K_1 : la capacidad de carga de la especie 1 o densidad máxima de la población K_2 : la capacidad de carga de la especie 2 o densidad máxima de la población r_1 : el rango de crecimiento intrínseco α : coeficiente de competición de la especie 1

r_2 : el rango de crecimiento intrínseco α : coeficiente de competición de la especie 2

Considerando las características de las dos especies analizadas, se ha aplicado el modelo en base a densidades porcentuales por superficie ocupada en la transecta (1x1m). Con el fin de obtener resultados ajustados a las mismas, que ilustren las interacciones entre ambas.

Los rangos de crecimiento intrínseco representan constantes, tomando como referencia los trabajos de Rosso et al. (2012) y Bianchini et al. (2015), respectivamente.

Composición química de ácidos graso de Chara Braunii

Conforme al protocolo otorgado por los laboratorista, las muestras de la macroalga fueron lavadas con agua destilada y pesadas en cantidad de 300 gramos. Fueron colocadas en bolsa de polietileno y conservadas en frío con bolsas de gel congeladas para su transporte hasta el laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Programa de Efluentes Industriales y Urbanos (PEIU), Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

Análisis por cromatografía líquida de alta frecuencia (HPLC).

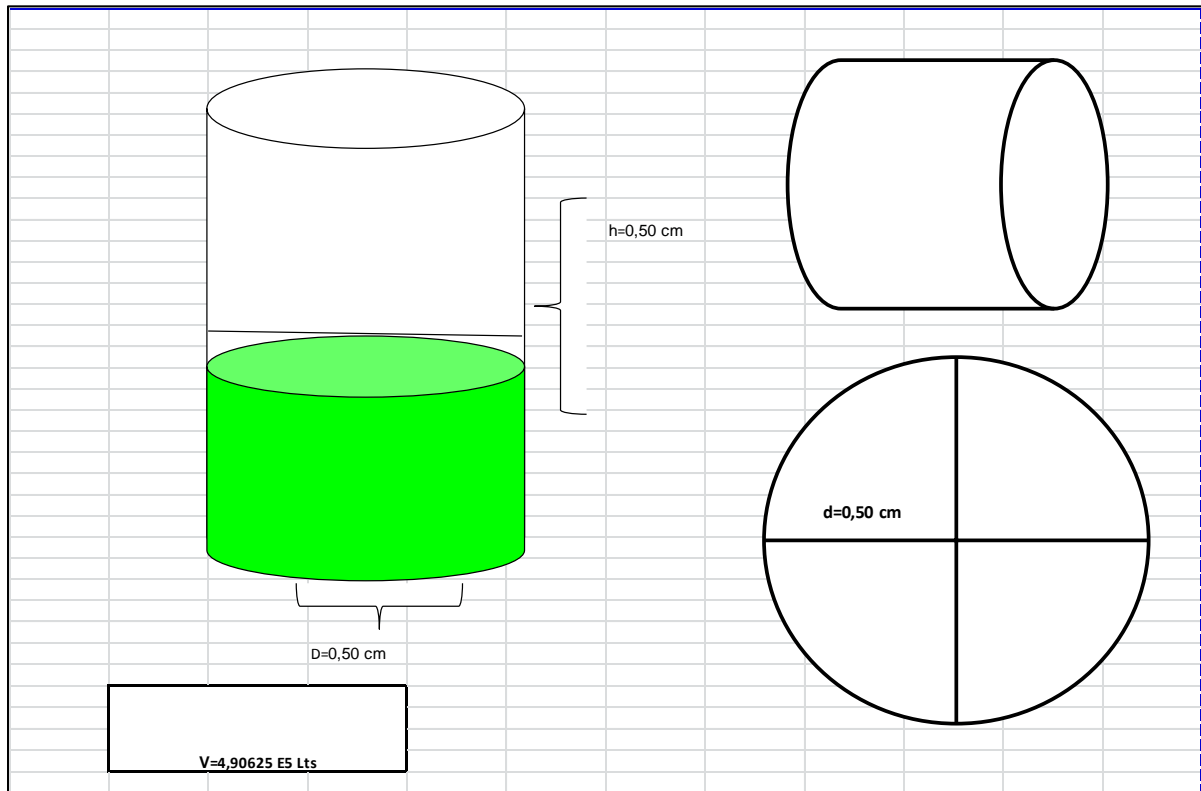
Se realizó el análisis de 27 parámetros de ácidos grasos presentes en una muestra de 300 gramos de *Chara Braunii* conforme a la Norma AOC 996.1. La materia grasa se obtuvo secando la muestra y extrayendo los ácidos con éter. Los resultados fueron expresados en base seca. Se determinó humedad de la muestra a 103 ± 1 °C.

Extracción de esencia

Se procedió al lavado de las muestras de *Chara Braunii* con agua destilada y posterior molienda para la destilación y obtención de esencia por las técnicas de arrastre de vapor y soxhlet (Álvarez, Meléndez, & Cosío, 2012), en este caso se aplicó hexano como solvente. Se utilizaron un total de 900 gramos del material para la obtención de esencia por ambas técnicas (Anexo IV).

Diseño de fotobiorreactor

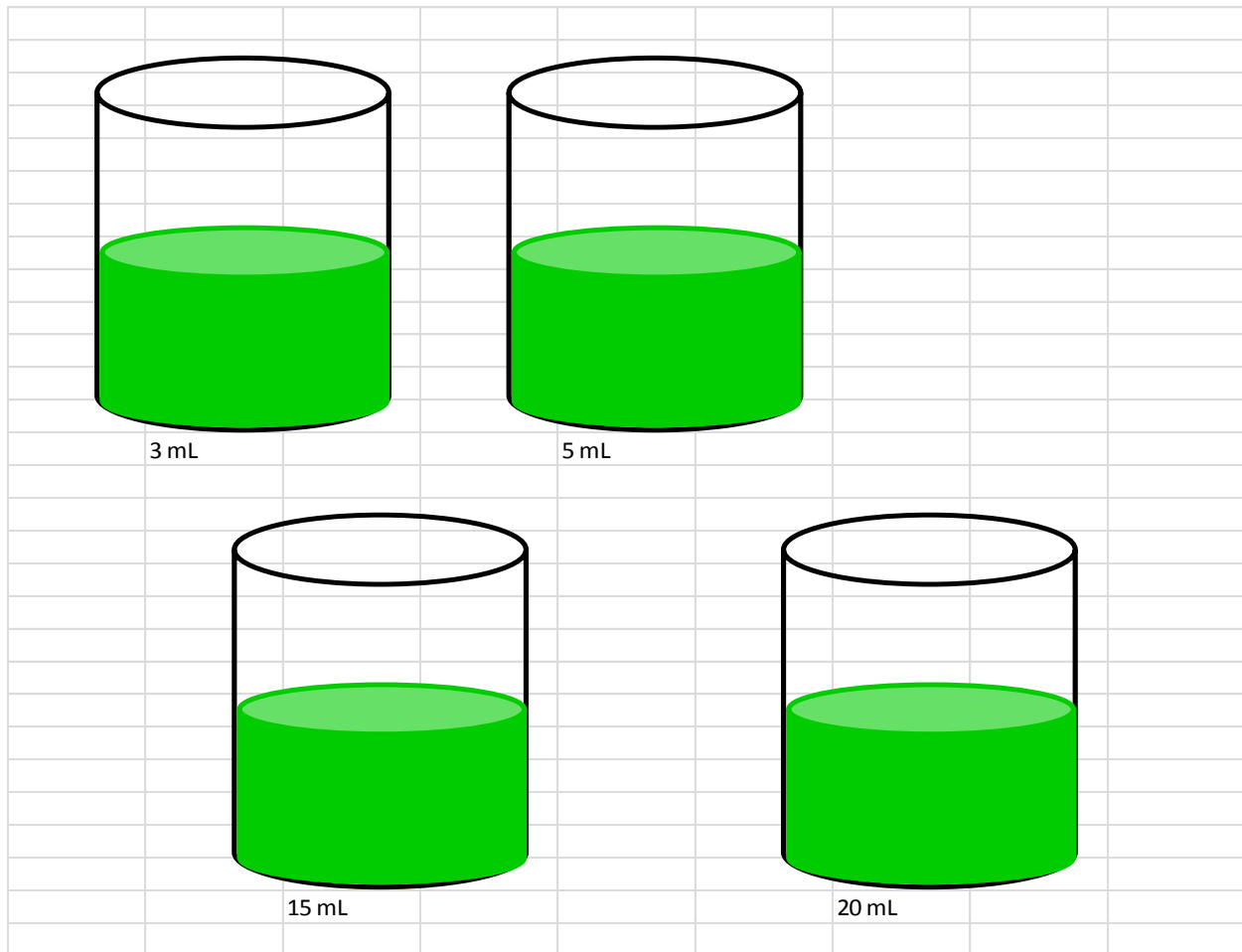
Se realizó una revisión bibliográfica sobre fotobiorreactores para adaptarlos al trabajo. A partir de allí, se diseñó el fotobiorreactor teniendo en cuenta aspectos como suministro de luz con emisores de luz (LED), provisión y transferencia de CO₂, acumulación de oxígeno, y mezcla, con compresores y bomba para sistema de aireación. Además de la adhesión de un luxómetro para la medición de intensidad de la irradiancia. Se procedió al diseño optándose por el fotobiorreactor tubular de vidrio para un cultivo intermedio con un volumen de 5 litros (Ilustración 3-Anexo II).

Ilustración 3 Diseño de fotobiorreactor

Fuente. Elaboración propia

Prueba de inhibición

La prueba se realizó utilizando diferentes concentraciones (3mL, 5 mL, 15 mL, 20 mL). Así también se probó el extracto en 1 litro de floración natural para la observación de su respuesta y contando con 1 control/testigo para el monitoreo del crecimiento poblacional.

Ilustración 4 Diseño de dosificación experimental del extracto

Fuente: Elaboración propia

Durante la experimentación, se recogió a diario de cada fotobiorreactor 1 ml de solución cultural y del control por un periodo de 5 días.

Calculando la concentración celular del control y los cultivos en los que se aplicaron las dosis de esencia de *Chara Braunii*, para ello se utilizó una cámara Neubauer aplicando la fórmula:

Concentración celular: $N \times 10000 / N^\circ$ de cuadros; (**Ecuación 7**) (Tortora *et.al.* 2007)

Dónde: N es el número de células contadas en los cuatro cuadros grandes

Posteriormente, se calculó la relación de inhibición o Rango inhibitorio (IR) con la siguiente fórmula:

$$IR = 1 - (N_t / N_o) \times 100 \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Dónde:

N_t : Número de *Microcystis aeruginosa* en tratamiento

N_o: Número de *Microcystis aeruginosa* en control.

Diseño experimental

Los resultados fueron descritos con base en la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

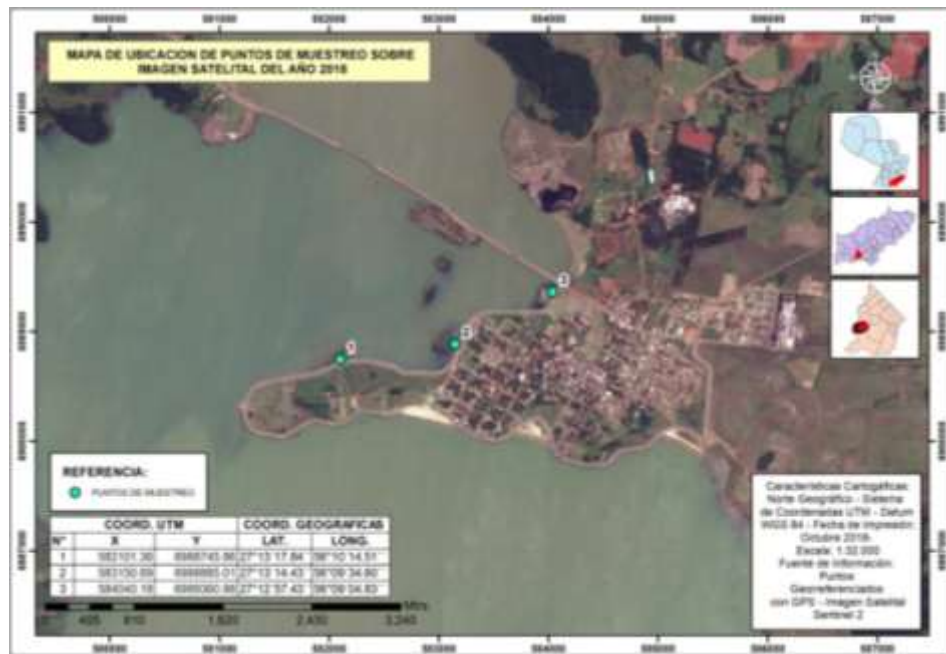
Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) en base a los datos de cel/mL en función a los días de experimentación y los datos del Rango inhibitorio en función a las dosis empleadas en la experimentación, y se realizó la prueba a posteriori empleándose la comparación de medias por el método Fisher (LSD), eligiéndose éste debido según Saville (1990), presenta ventajas como simpleza, es concistente, se puede utilizar en diseños no balanceados y con desigualdad de varianzas; su potencia es excelente y su error tipo I es conocido y constante. Para ello, se ha empleado el software estadístico Statgraphics Centurión XVI.II (Polhemus, 2005)

Marco Analítico

Resultados

Área de estudio

Ilustración 5 Localización del área de puntos de muestreo



Fuente: Elaboración propia

En la ilustración 5, se observan los 3 sitios de muestreo seleccionados en el embalse Tacuary, estos se ubican en la margen izquierda del mismo. Presentan una profundidad de entre 1,00 a 2,50 m. en la zona litoral. Siendo unos 10 años atrás, áreas de cultivo de arroz y remanentes boscosos anegados por la represa Yacyretá. En los mismos se observó la presencia de otras especies de macrófitas acuáticas siendo amplia la diversidad. Estos puntos de muestreo presentan condiciones de temperatura promedio anual de 22,0 °C, conductividad de 78,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y pH básico a alcalino en promedio anual, siendo condiciones del agua consideradas óptimas para el desarrollo de carófitos. Estas áreas reciben aportes de efluentes de industrias arroceras distantes a pocos metros del mismo. Por lo general, las zonas de distribución son áreas con poca influencia

del viento, en las mismas se ha observado diversidad de aves, mantarrayas pequeños y alevines para las utilizan para su protección.

Ilustración 6 Punto de muestreo 3. Floración alga en el embalse Tacuary. Fecha: 24-03-2018



Fuente: Elaboración propia.

En la ilustración 6, se observa el tipo de floración algal en el embalse, el cual es acumulativo y en superficie, bastante densa, en ocasiones formando películas verdosas o grumos verdes brillante sobre la superficie. Su principal área de formación es la zona litoral del embalse, siendo más frecuente en los sitios de muestreo N° 1 y 3 como se observa, está asociada a las comunidades de carófitos del embalse.

Tabla 6 Promedio anual de parámetros fisicoquímicos en los puntos de muestreo

Variación de parámetros fisicoquímicos de la margen izquierda de la Cuenca del Arroyo Tacuary								
	Puntos de muestreo	OD	Conductividad	TDS	DQO	Temperatura	pH	transparencia
Otoño	1	8,75	70,5	38,2	25,0	20,4	8,25	0,65
	2	8,95	71,2	38,4	101,0	19,6	7,38	0,80
	3	8,86	71,2	38,6	152,0	19,8	7,31	0,65
Invierno								
	1	8,97	75,2	41,3	8,77	18,8	6,41	0,70
	2	9,86	74,7	40,7	8,77	18,4	6,54	0,50
	3	9,30	81,6	45,0	8,77	18,6	6,38	0,60
Primavera								
	1	7,97	89,7	48,8	7,0	24,0	7,46	0,40
	2	8,57	90,6	49,1	7,6	24,5	6,71	0,5
	3	8,20	96,1	52,0	5,1	23,4	6,60	0,4
Verano								
	1	7,77	72,4	38,8	13,0	25,3	7,51	0,35
	2	7,52	75,1	40,3	13	25,7	6,95	0,65
	3	7,47	76,1	40,9	8,3	25,6	6,83	0,60
Promedio anual		8,51	78,7	42,675	29,9	22,0	7,03	0,57

Fuente: (López Pereira, 2014)

Las características anuales en los puntos de muestreo indican que cuenta con buena oxigenación, baja conductividad, sólidos disueltos y DQO, presentado un promedio de 22 °C de temperatura del agua y aguas claras con 0,57 m de transparencia Secchi (Tabla 5).

Tabla 7 Promedio de parámetros fisicoquímicos medidos in situ en los puntos muestreos

Puntos	OD (mg/L)	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	TDS (mg/L)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	pH
1	7,65	73,3	39,2	26,9	7,63
2	6,66	75,3	40,4	28,9	7,43
3	8,85	70,9	38,4	19,9	7,7

Fuente: Elaboración propia, 2018

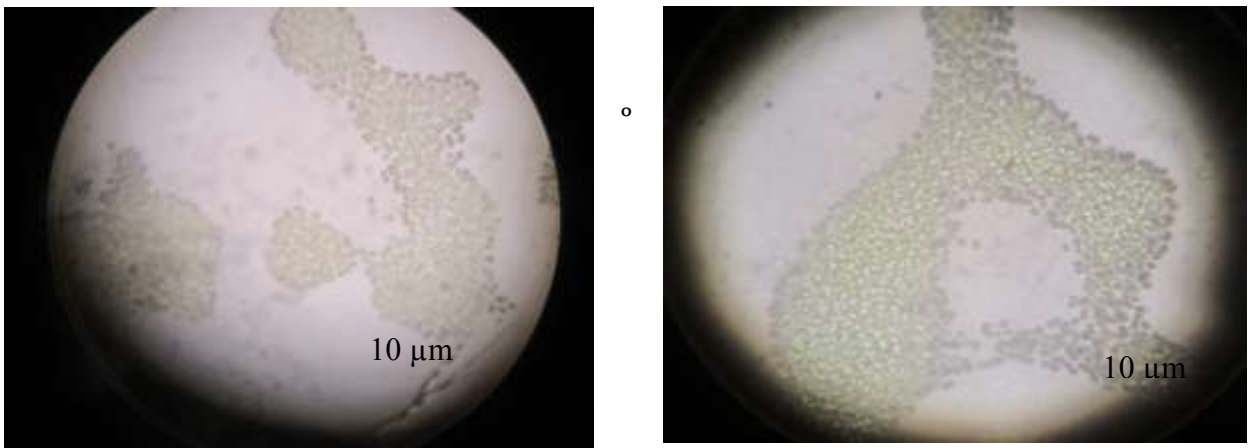
En la Tabla 6 se indican las condiciones promedio presentadas en los sitios de muestreo durante las colectas, entre las cuales se destaca la buena oxigenación con una máxima de 8,85 mgO/L, baja conductividad promedio así como baja concentración de sólidos totales disueltos. La temperatura promedio fue cálida en los puntos 1 y 2 a templada en el punto 3 y condiciones de pH básico a alcalino.

Identificación taxonómica de cianobacteria

Orden: Chrooccales

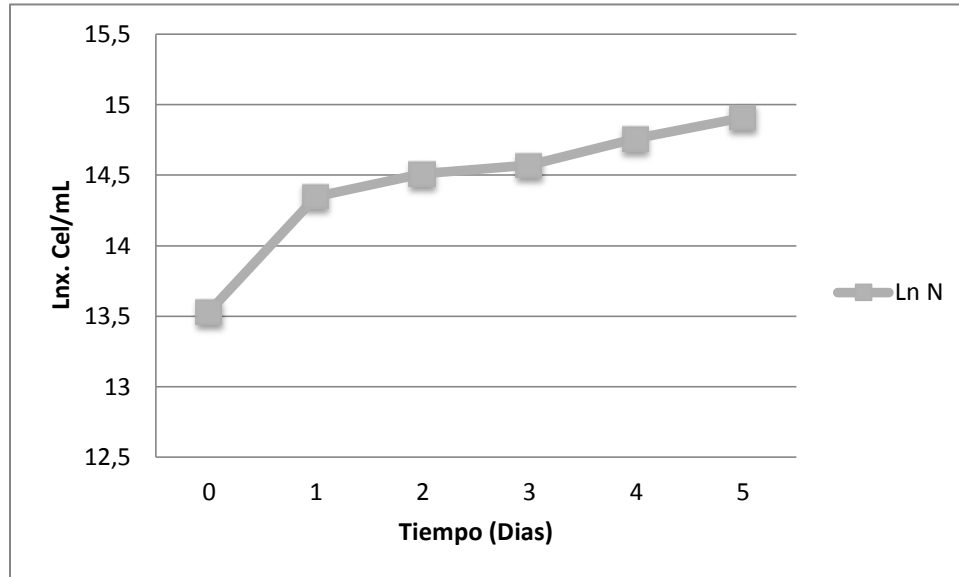
Especie: *Microcystis aeruginosa* (Kuntzing) Kuntzing 1866

Ilustración 7- 8. Colonias de Microcystis aeruginosa del embalse Tacuary, Carmen del Paraná



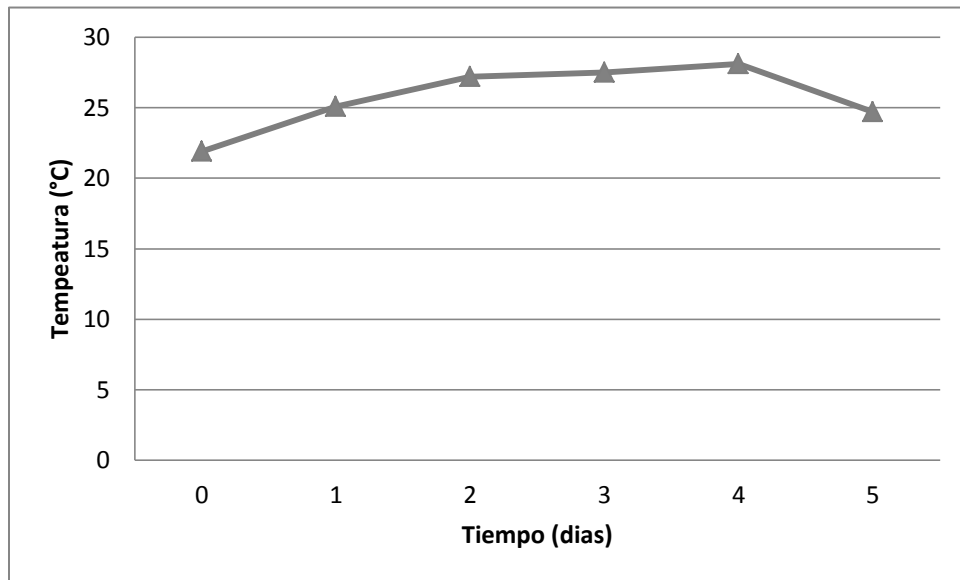
Fuente: Elaboración propia. Fecha: 20-06-2018

Como se observa en las ilustraciones 7 y 8, se hallaron colonia irregulares con las características de *Microcystis aeruginosa*. Siendo en su mayoría células esféricas, presentado aerótopos. En algunos casos, las células que tenían tonalidades más oscuras debido a la gran densidad de su aerótopos que se concentran en el centro de las colonias. Así también, contaban con mucílago transparente, presentado división celular al momento de la observación (Anexo VII)

Gráfico 2 Curva de crecimiento *Microcystis aeruginosa*

Fuente: Elaboración propia

La curva de crecimiento celular del cultivo de *Microcystis aeruginosa* indica que hubo un aumento significativo, luego de la fase lag, siendo exponencial a partir del 1er. día de experimentación alcanzando su fase estacionaria en el 2do. al 5to. día, presentando el comportamiento típico del crecimiento celular microbial, considerando que la reproducción de *Microcystis aeruginosa* es en horas.

Gráfico 3 Curva de temperatura del cultivo

Fuente elaboración propia

La temperatura del cultivo se mantuvo en un promedio de 25,7 °C, con una máxima de 28,1 °C y una mínima de 21,9°C (Gráfico3). El rango de crecimiento de *Microcystis aeruginosa* aumentó en relación al incremento de 4 °C de la temperatura inicial.

Tras las pruebas experimentales del fotobiorreactor construido, se suprimió el sistema de bombeo por compresión para la oxigenación, debido a que generaba la muerte celular del cultivo por la velocidad de mezcla. Realizándose la oxigenación manual tres veces por día.

Tabla 8 Ln de la concentración celular, tasa de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (Td), temperatura del cultivo de *Microcystis aeruginosa* ($^{\circ}\text{C}$)

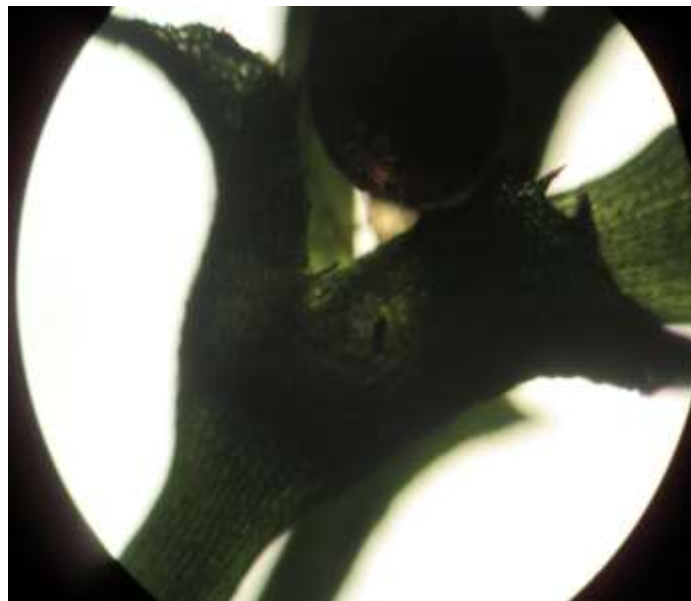
Días	Ln N	μ (día-1)	Td	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
0	13,53			21,9
1	14,35	0,357	1,94	25,1
2	14,51	0,212	3,26	27,2
3	14,57	0,150	4,62	27,5
4	14,76	0,134	5,1	28,1
5	14,91	0,120	5,7	24,7

Fuente: Elaboración propia

Los máximos rangos de crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en condiciones experimentales fueron de 0,357 día-1 a 25,1 $^{\circ}\text{C}$ con 1,94 días en tiempo de duplicación en el día 1 y 0,212 día-1 a 27,2 $^{\circ}\text{C}$. Con un rango mínimo de 0,12 día-1 a 24,7 $^{\circ}\text{C}$ en el día 5, siendo el tiempo de duplicación promedio de 4,124 días (Tabla 7), no observándose variaciones significativas de crecimiento durante los demás días de experimentación.

Identificación taxonómica de macrófita**Especie:** *Chara braunii* C.C.Gmelin**Familia:** Characeae**Nombre común:**

Hábitat: Las áreas donde se encuentran formaciones densas de carófitos en el embalse Tacuary, por lo general, son en la zona litoral de la margen izquierda, en áreas de poca profundidad de 1,00 a 2,50 m., alejadas de la influencia del viento y el oleaje característico del embalse. En las estaciones de primavera y verano está asociada a otras especies de macrófitas acuáticas, pero por lo general las formaciones densas están separadas del resto de diversidad de plantas acuáticas en el lugar. Es importante destacar que estas áreas fueron campos de cultivo de arroz inundados recientemente, característica específicas del hábitat preferible por esta especie según la literatura.

Ilustración 8 Brácteas y Oogonios (1,25 μ)

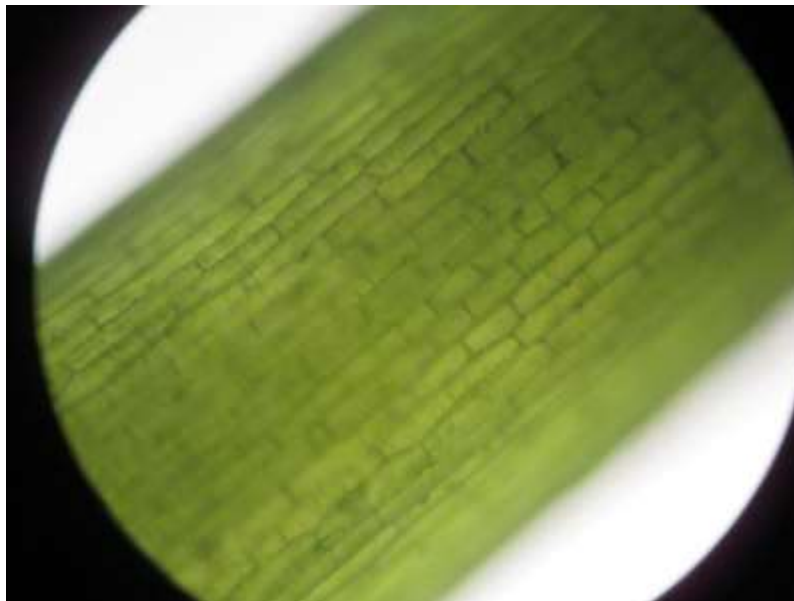
Fuente: Elaboración propia

Ilustración 9 Chara Braunii Gmelin con rizoides



Fuente: Elaboración propia

Ilustración 10 Talo



Fuente: Elaboración propia

Ilustración 11 Acícula

Fuente: Elaboración propia

Análisis de la interrelación entre la especie

En el análisis del modelo de competición interespecífica de Lotka-Volterra se destaca que durante la estación otoño existió una coexistencia estable entre ambas especies en todos los puntos (Gráficos 4-5 y 6), siendo, en el punto 1, la densidad de *Chara Braunii* mayor a la de *Microcystis aeruginosa*, las mismas evolucionaron con el tiempo alcanzando un punto de equilibrio (Gráfico 4, Gráfico 7).

En el punto 2, el comportamiento en el tiempo indica una población mayor de *Chara Braunii* que decreció a lo largo de los días; y una población inferior de *Microcystis aeruginosa* que aumenta con el tiempo (Gráfico 8), no obstante alcanzan un punto de equilibrio ($KA/\alpha \geq KB$) (Gráfico 5).

En la estación invierno, en el punto 1 la densidad de *Chara Braunii* redujo a *Microcystis aeruginosa* por exclusión competitiva (Gráfico 10).

En los puntos 2 y 3 se dio un punto de equilibrio entre ambas poblaciones, dándose una coexistencia estable ($K_A / \alpha \geq K_B$) (Gráfico 11-12)

Sin embargo en la estación primavera, la densidad de *Chara* fue superior a la de *Microcystis* por lo tanto esta disminuyó el tamaño de su población, dándose una exclusión competitiva (Gráfico 16-17-18) Manteniendo una alta densidad de *Chara Braunii* durante la primavera (Gráfico 10-20-21)

En los puntos 1 y 2, durante la estación verano, *Chara Braunii* creció y la densidad poblacional de *Microcystis aeruginosa* disminuyó, dándose una exclusión competitiva de *Microcystis aeruginosa* por *Chara Braunii* (Gráfico 22-23). No obstante en el punto 3 existe una coexistencia estable, dándose un punto de equilibrio en el crecimiento de ambas poblaciones hasta alcanzar su capacidad de carga (Gráfico 24). Indicando que ante cualquier perturbación aleatoria del medio, el tamaño de las poblaciones tendió al equilibrio durante ese periodo.

En los gráficos de comportamiento en el tiempo, de ambas especies a través del modelo de tendencia de crecimiento de Lotka-Volterra, se observó que *Chara Braunii* alcanzó un crecimiento exponencial hasta obtener un valor de equilibrio (K), mientras que *Microcystis aeruginosa* se vio desplazada en su crecimiento a una densidad poblacional inferior (Gráficos 7-9, 13-14, 19-20-21, 25-26-27), a excepción del punto 3 de la estación invierno donde la población inicial de *Microcystis aeruginosa* aumentó hasta lograr un equilibrio con *Chara Braunii* (Gráfico 15), así como el punto 2 en la estación otoño en que la densidad de *Microcystis aeruginosa* tuvo un crecimiento exponencial hasta alcanzar su valor de equilibrio (K) en relación a la disminución de la población de *Chara Braunii* en el punto (Gráfico 5-8).

Por ende en las estaciones primavera y verano, se da exclusión competitiva de *Microcystis aeruginosa* siendo *Chara Braunii* la de mayor competitividad espacial. No obstante en otoño e invierno, se da una coexistencia estable entre ambas especies, a excepción del punto 2 donde se

da exclusión competitiva de *Microcystis aeruginosa* por parte de *Chara Braunii* la importancia del conocimiento de la dinámica poblacional en condiciones naturales y sobre todo, en un embalse de reciente formación, radica en la comprensión o determinación de especies que podrían influir en la exclusión o coexistencia de otras, en el caso en particular, la influencia que podría tener *Chara Braunii* sobre la población de *Microcystis aeruginosa* para su control.

Tabla 9 Densidad estacional de especies en los sitios de muestreo del embalse Tacuary, Paraguay (Parcela de 1x1m)

<i>Microcystis aeruginosa</i>					
Sitio de muestreo	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	MAX % año
1	41,0	50,2	20	10	50,2
2	47,49	78	44,5	31	78,0
3	70	100	42	23	100

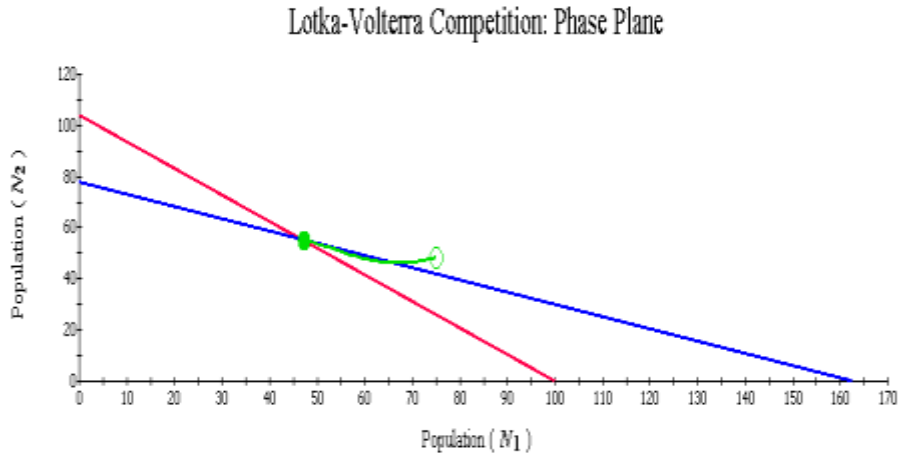
<i>Chara Braunii</i>					
Sitio de muestreo	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	MAX % año
1	75	50	50	100	100
2	75	50	100	100	100
3	75	50	100	100	100

Fuente: Elaboración propia

Los resultados del método de abundancia relativa para *Microcystis aeruginosa* indicaron que hubo floraciones en el punto 3 principalmente en las estaciones de otoño, invierno y verano

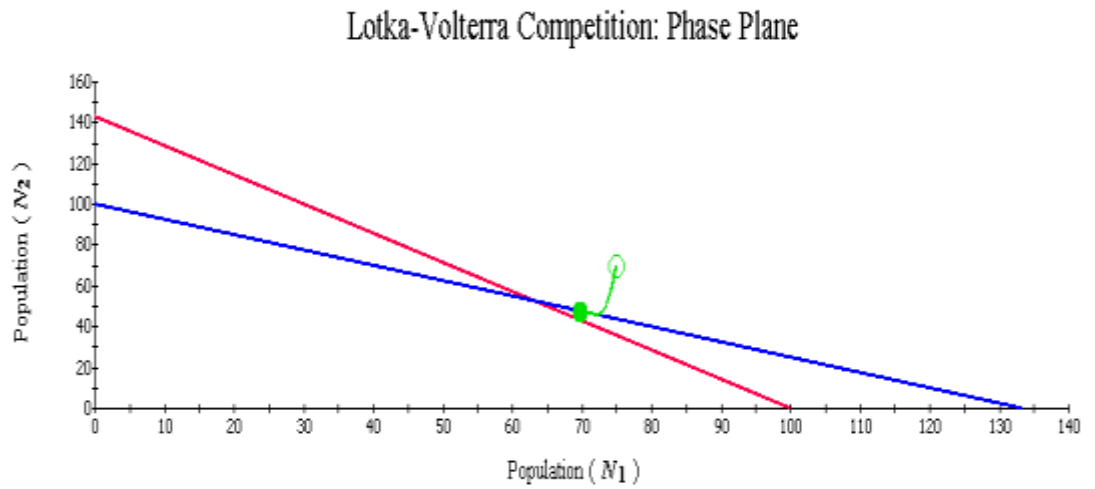
En cuanto a *Chara Braunii*, los resultados del método indicaron un cobertura máxima en las transectas, durante las estaciones de otoño, primavera y verano, coincidiendo con los porcentajes de abundancia relativa de *Microcystis aeruginosa*.

Gráfico 4 *Curvas de competencia interespecífica entre Chara Braunii y Microcystis aeruginosa en el embalse Tacuary PUNTO 1*



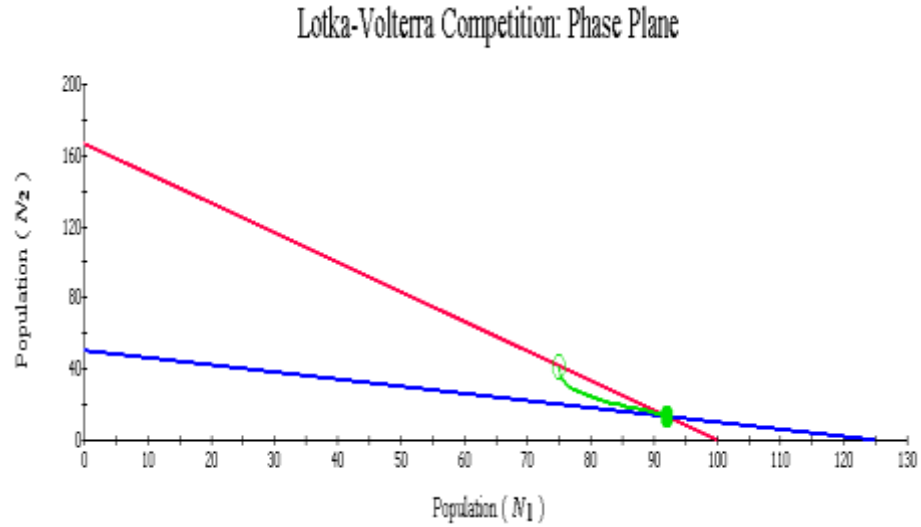
Fuente: Elaboración

Gráfico 5 *Curvas de competencia interespecífica entre Chara Braunii y Microcystis aeruginosa en el embalse Tacuary PUNTO 2*



Fuente: Elaboración propia

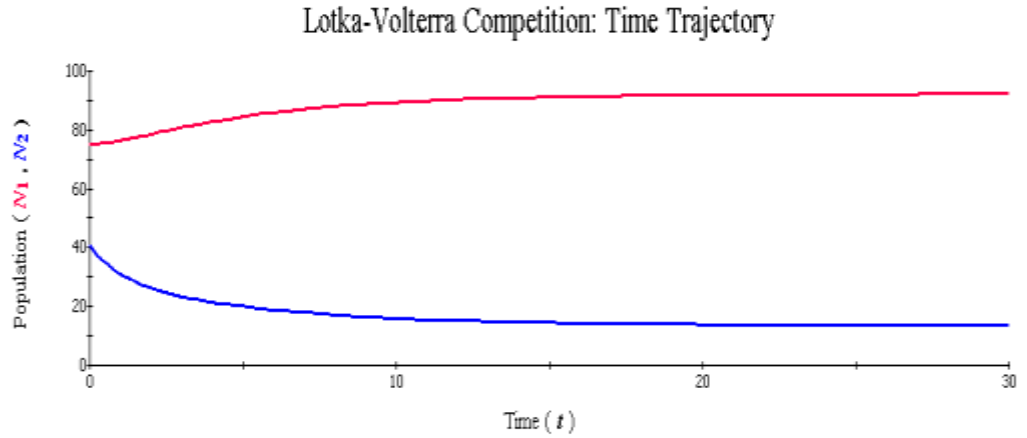
Gráfico 6 Curvas de competencia interespecífica entre *Chara Braunii* y *Microcystis aeruginosa* en el embalse Tacuary PUNTO 3



Fuente: Elaboración propia

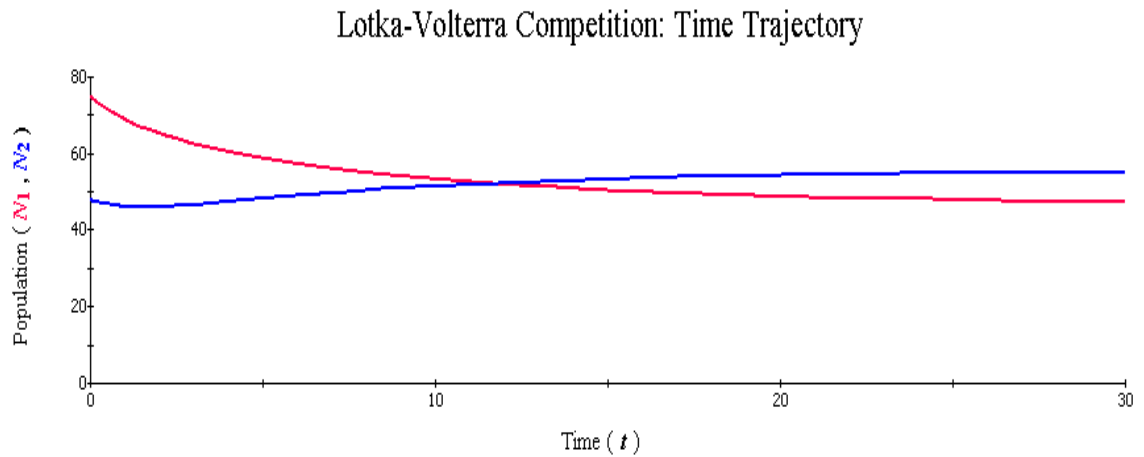
En los gráficos 4,5 y 6 de curva de competencia interespecífica entre *Chara Braunii* y *Microcystis aeruginosa* en el embalse Tacuary. Se muestra que en los puntos de muestreo puntos 1, 2 y 3, la densidad de *Chara Braunii* (N_1) fue mayor a la de *Microcystis aeruginosa* (N_2), sin embargo, alcanzaron un equilibrio estable, lo que determinó la coexistencia de ambas especies durante la estación otoño

Gráfico 7 Trayectoria de crecimiento de *Chara Braunii Gmel (N1)* y *Microcystis aeruginosa (N2)*, durante la estación otoño PUNTO 1



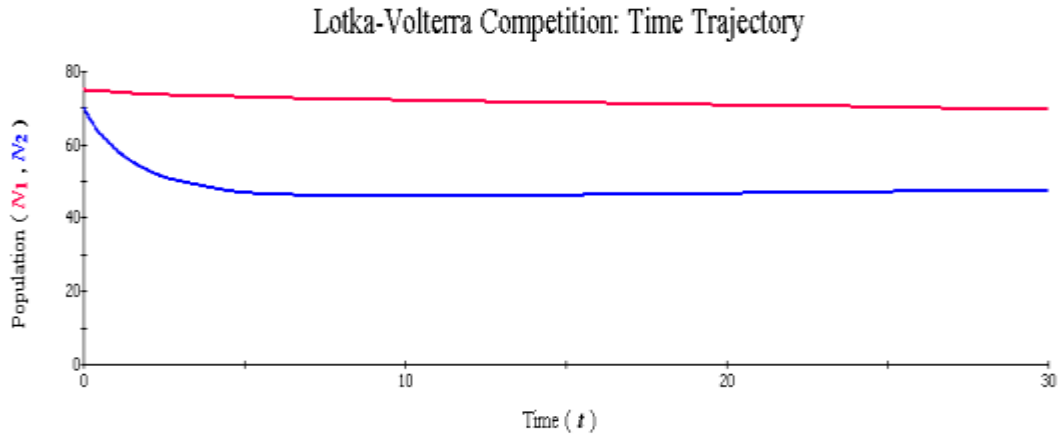
Fuente: Elaboración propia

Gráfico 8 Trayectoria de crecimiento de *Chara Braunii Gmel (N1)* y *Microcystis aeruginosa (N2)*, durante la estación otoño PUNTO 2



Fuente: Elaboración propia

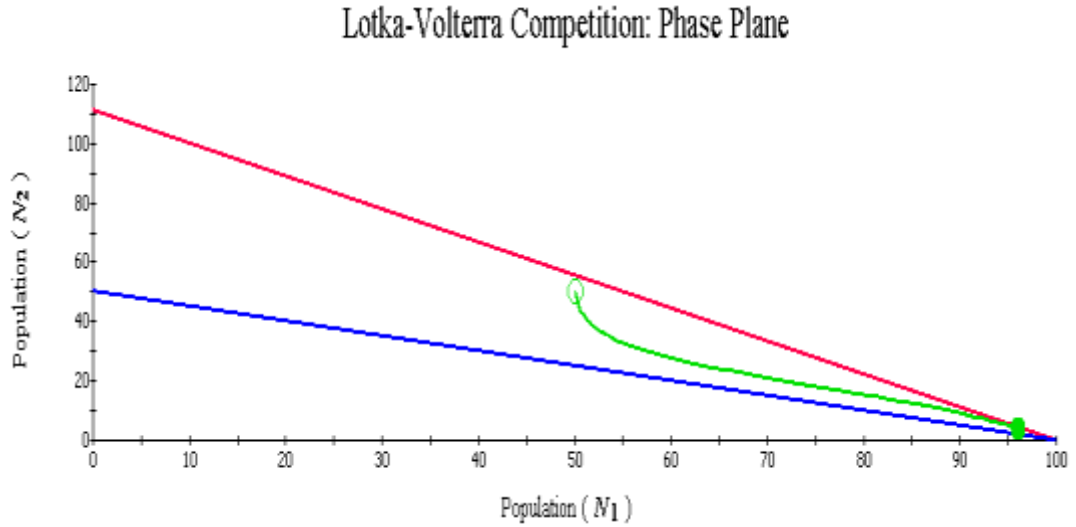
Gráfico 9 Trayectoria de crecimiento de *Chara Braunii* Gmel (N1) y *Microcystis aeruginosa* (N2), durante la estación otoño PUNTO 3



Fuente: Elaboración propia

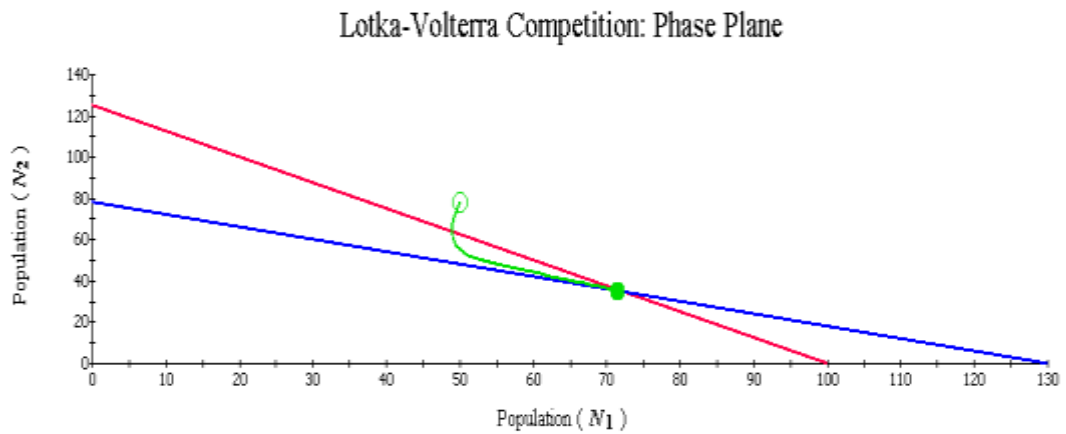
En los gráficos 7,8 y 9 de la trayectoria de crecimiento de *Chara Braunii* (N1) y *Microcystis aeruginosa* (N2), durante la estación otoño, se denota un crecimiento exponencial mayor de la especie *Chara Braunii* por sobre *Microcystis aeruginosa*.

Gráfico 10 *Curvas de competencia interespecífica estación invierno, dados los porcentajes de densidad de especies PUNTO 1*



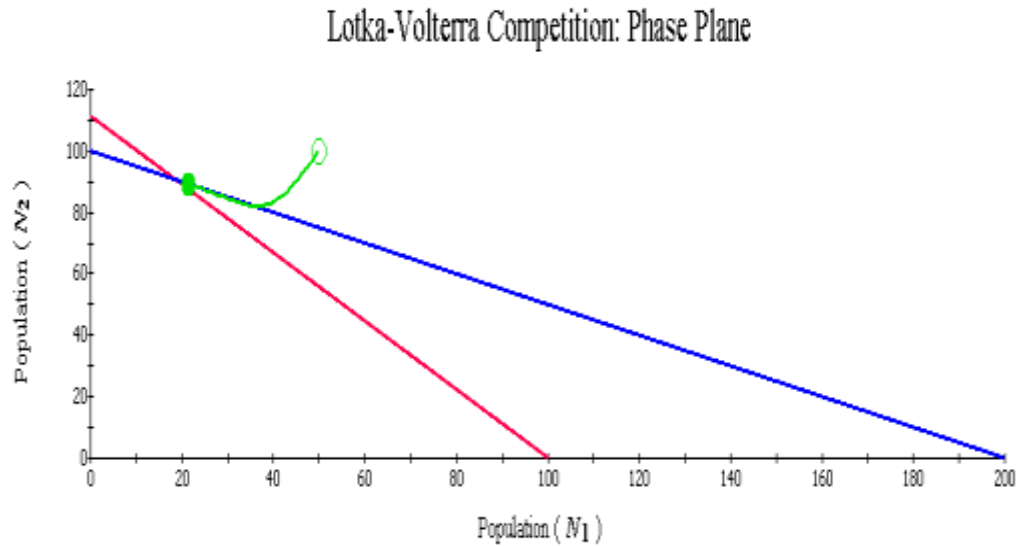
Fuente: Elaboración propia

Gráfico 11 *Curvas de competencia interespecífica estación invierno, dados los porcentajes de densidad de especies PUNTO 2*



Fuente: Elaboración propia

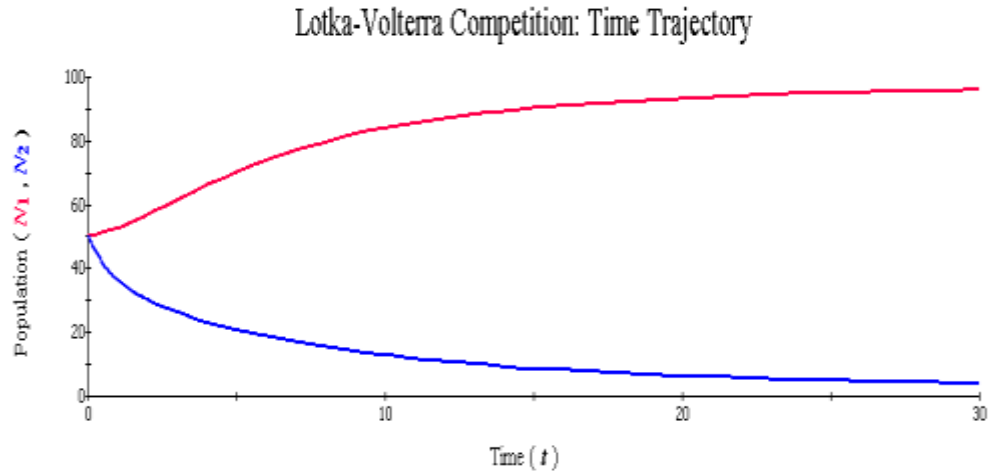
Gráfico 12 Curvas de competencia interespecífica estación invierno, dados los porcentajes de densidad de especies PUNTO 3



Fuente: Elaboración propia

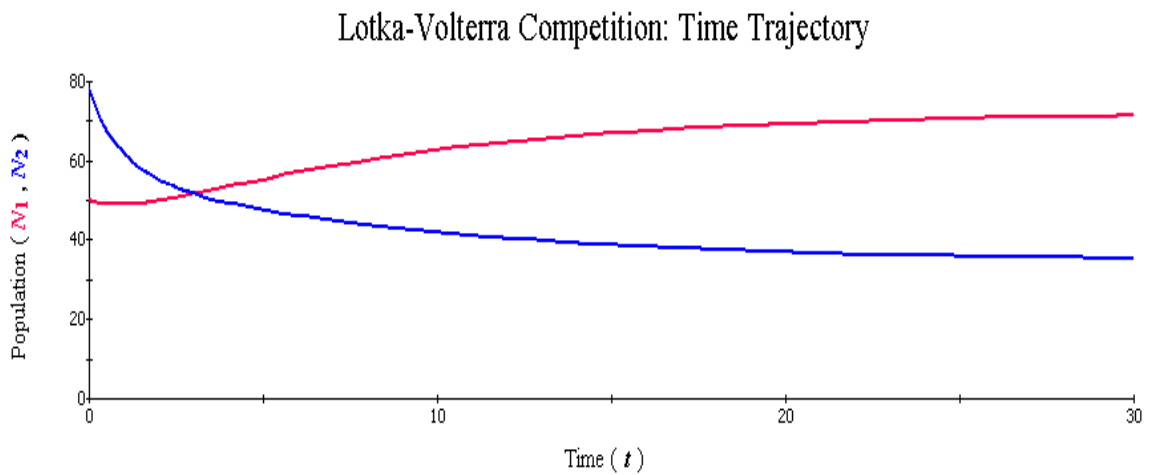
En los Graficos 10,11 y 12 de curvas de competencia interespecífica estación invierno, se demuestra que dados los porcentajes de densidad de especies: En el punto 1 la población de *Chara Braunii* tuvo un crecimiento superior a la población de *Microcystis aeruginosa* excluyéndola de la parcela. En el punto 2, existió un punto de equilibrio en el crecimiento de ambas poblaciones, dándose una coexistencia estable. En el punto 3, existió una coexistencia estable de ambas especies ($K_A/\alpha \geq K_B$)

Gráfico 13 Trayectoria de crecimiento de Chara sp. (N1) y Microcystis sp. (N2), durante las estación invierno PUNTO 1



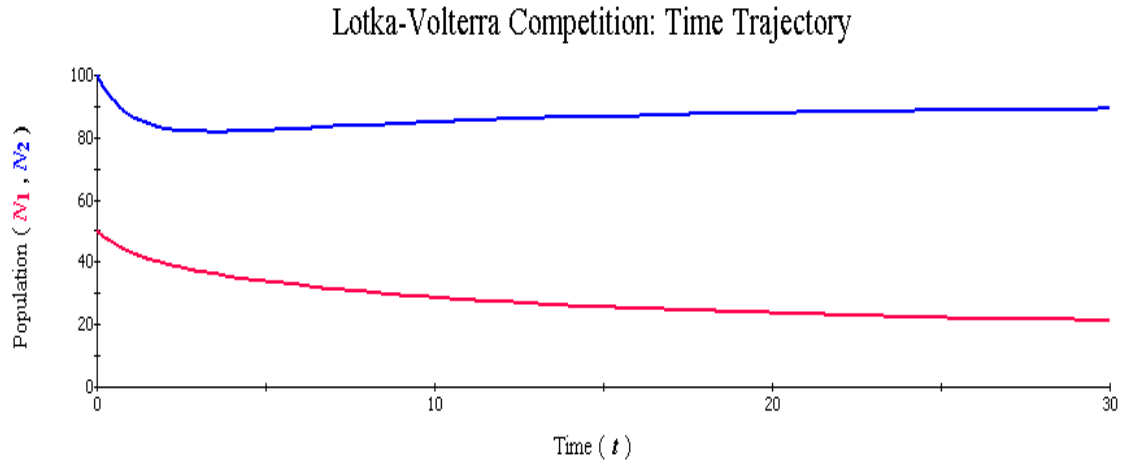
Fuente: Elaboración propia

Gráfico 14 Trayectoria de crecimiento de Chara sp. (N1) y Microcystis sp. (N2), durante las estación invierno PUNTO 2



Fuente: Elaboración propia

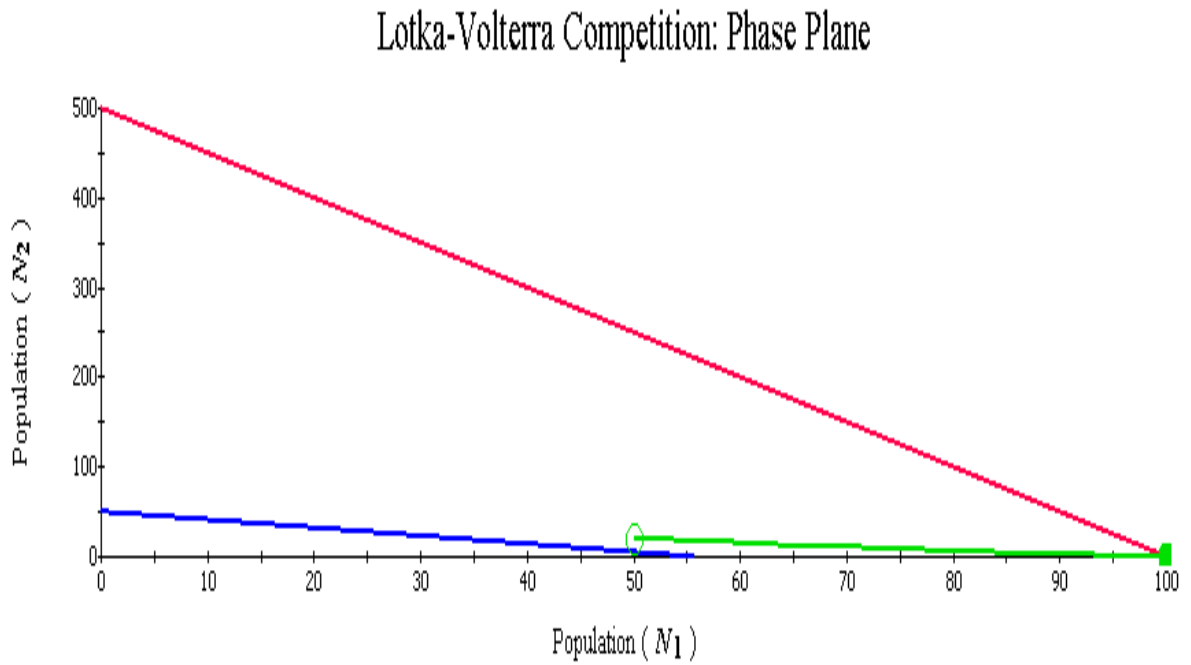
Gráfico 15 Trayectoria de crecimiento de *Chara sp.* (N1) y *Microcystis sp.* (N2), durante las estación invierno PUNTO 3



Fuente: Elaboración propia

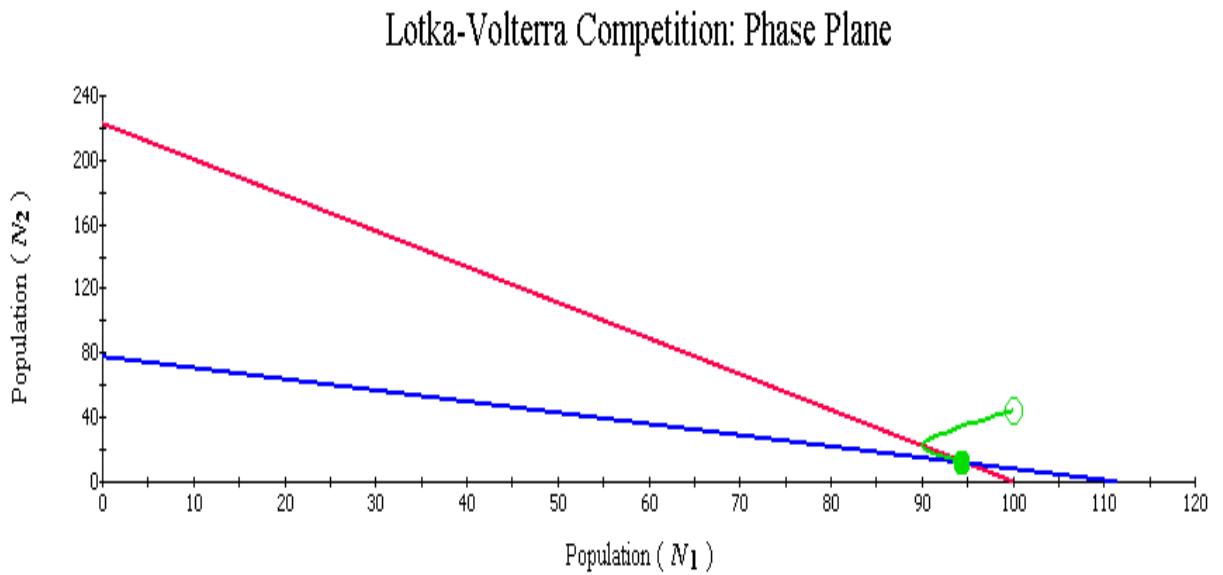
En los gráficos 7,8 y 9 de la trayectoria de crecimiento de *Chara Braunii* (N1) y *Microcystis aeruginosa* (N2), se denota un crecimiento exponencial mayor de la especie *Chara Braunii* por sobre *Microcystis aeruginosa* durante la estación invierno.

Gráfico 16 *Curvas de competencia interespecífica PUNTO 1*

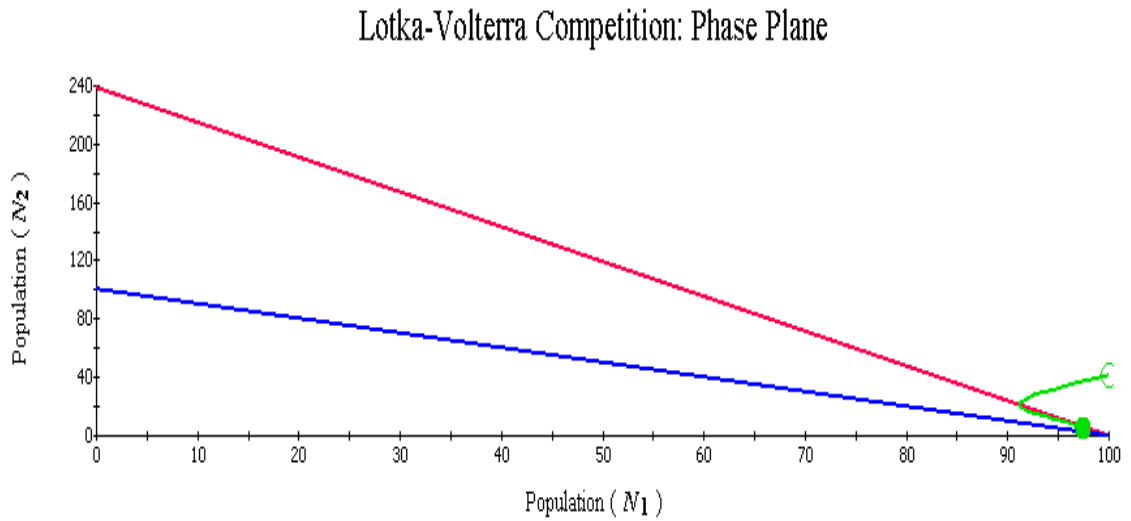


Fuente: Elaboración propia

Gráfico 17 *Curvas de competencia interespecífica PUNTO 2*



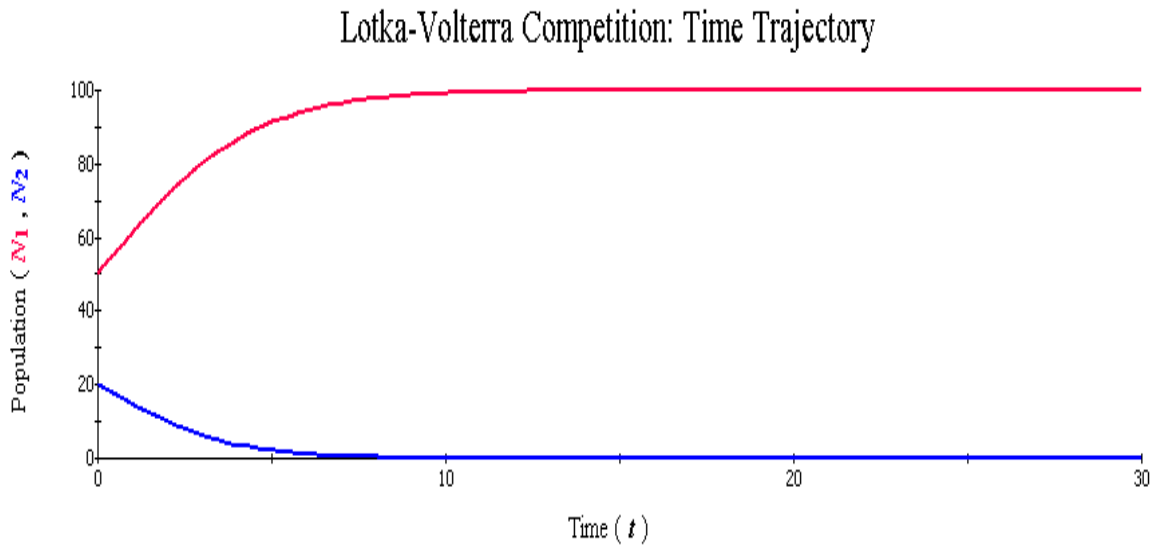
Fuente: Elaboración propia

Gráfico 18 Curvas de competencia interespecífica PUNTO 3

Fuente: Elaboración propia

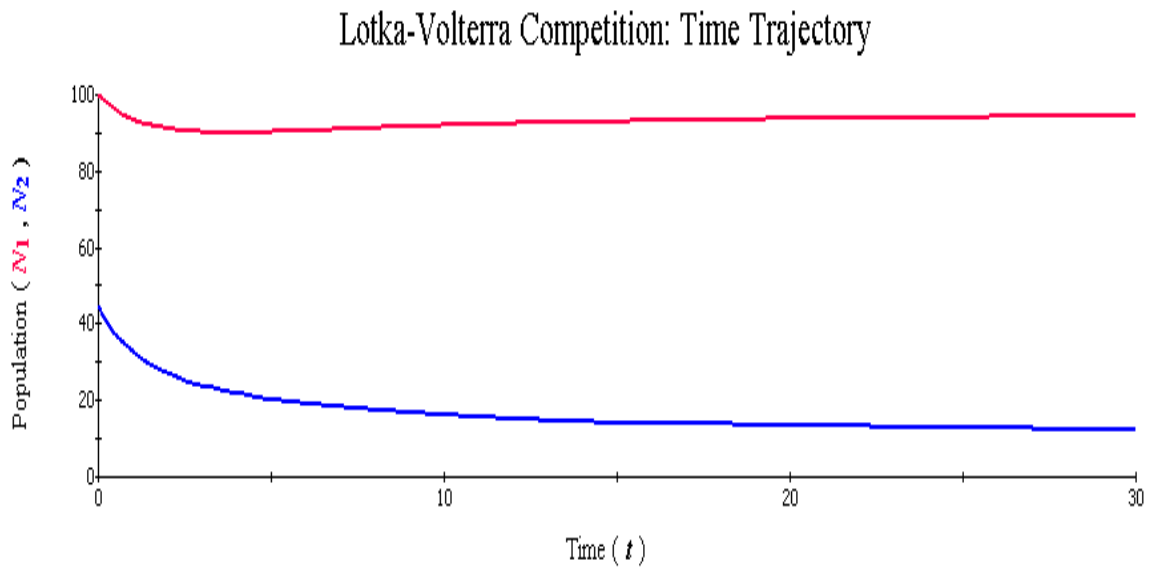
Gráficos 16, 17 y 18 de curvas de competencia interespecífica, en los puntos 1, 2 y 3, la densidad de *Chara Braunii* (N₁) aumentó y la de *Microcystis aeruginosa* (N₂) disminuyó con lo que *Chara Braunii*, excluyó a *Microcystis aeruginosa* ocurriendo exclusión competitiva durante la primavera.

Gráfico 19 Trayectoria de crecimiento de *Chara Braunii Gmel (N1)* y *Microcystis aeruginosa (N2)*, durante las estación primavera **PUNTO 1**



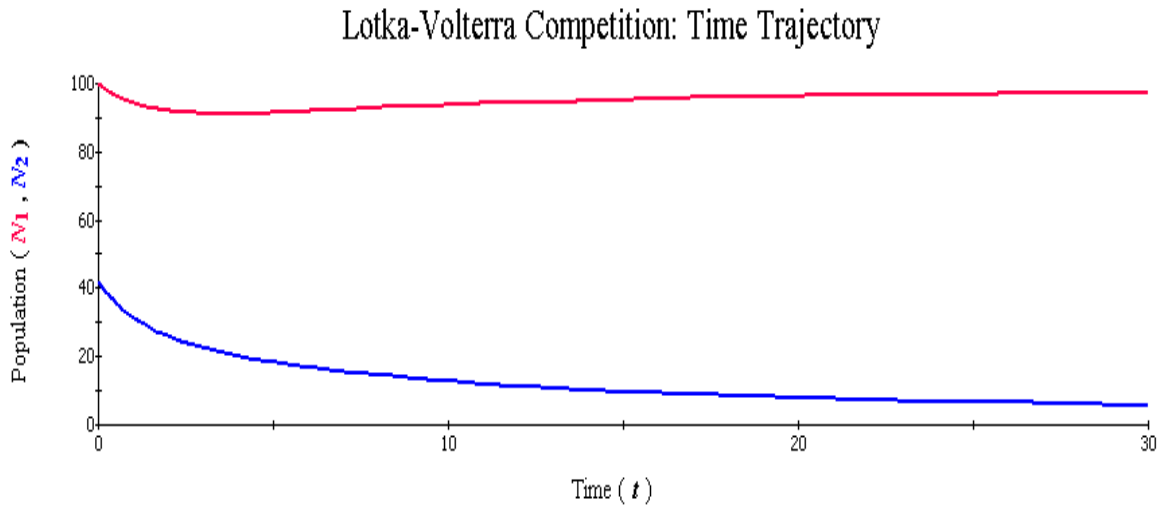
Fuente: Elaboración propia

Gráfico 20 Trayectoria de crecimiento de *Chara Braunii Gmel (N1)* y *Microcystis aeruginosa (N2)*, durante las estación primavera **PUNTO 2**



Fuente: Elaboración propia

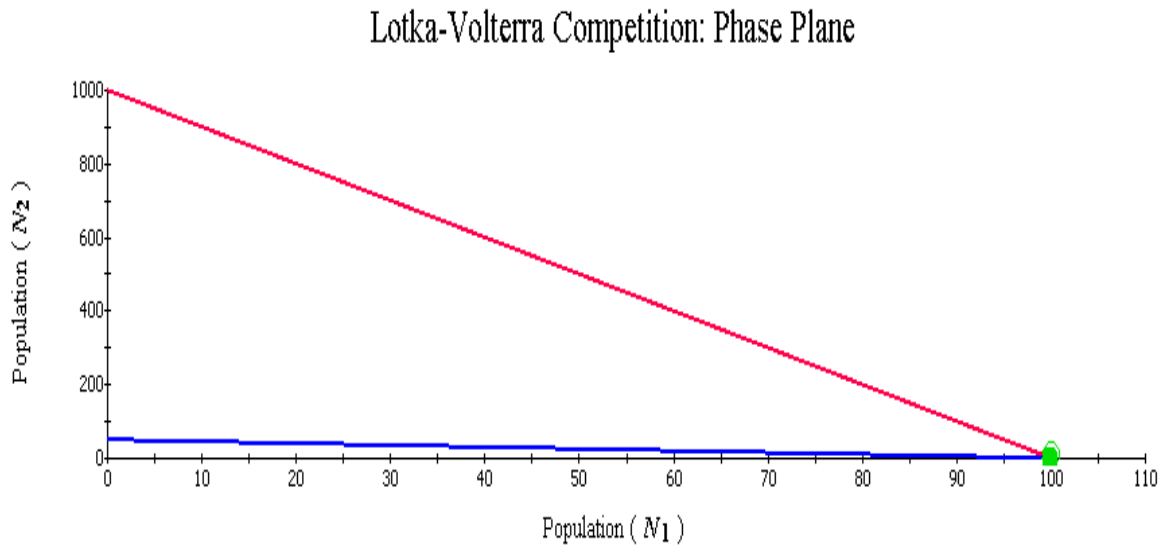
Gráfico 21 Trayectoria de crecimiento de *Chara Braunii* Gmel (N_1) y *Microcystis aeruginosa* (N_2), durante las estación primavera PUNTO 3



Fuente: Elaboración propia

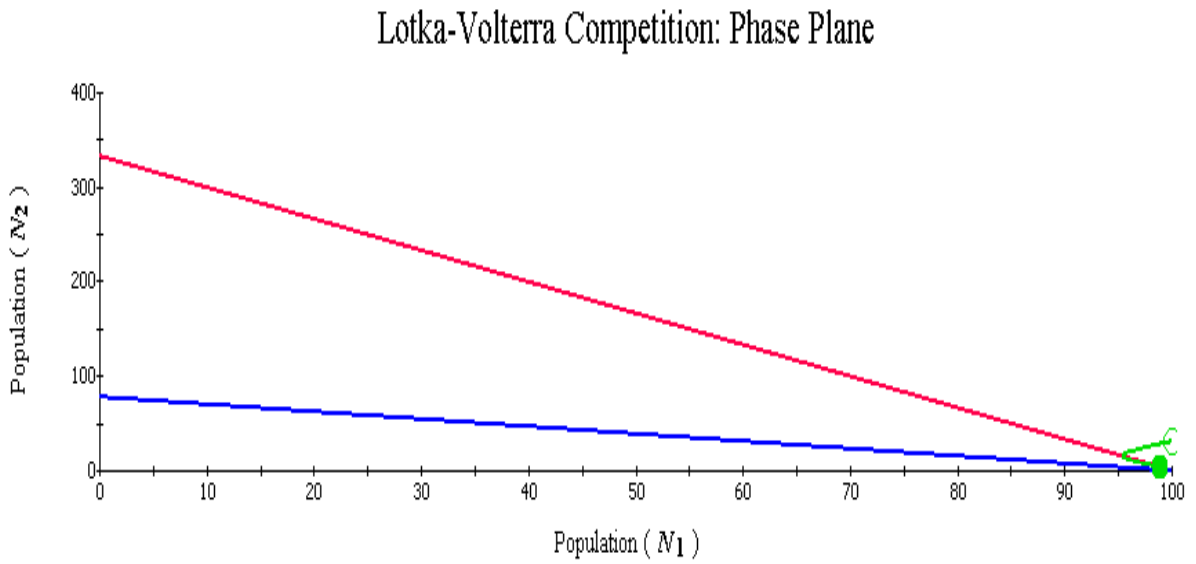
En los gráficos 19,20 y 21 de la trayectoria de crecimiento de *Chara Braunii* (N_1) y *Microcystis aeruginosa* (N_2), durante las estación primavera hubo un crecimiento superior de de la especie *Chara Braunii* en todos los puntos.

Gráfico 22 *Curvas de competencia interespecífica PUNTO 1*

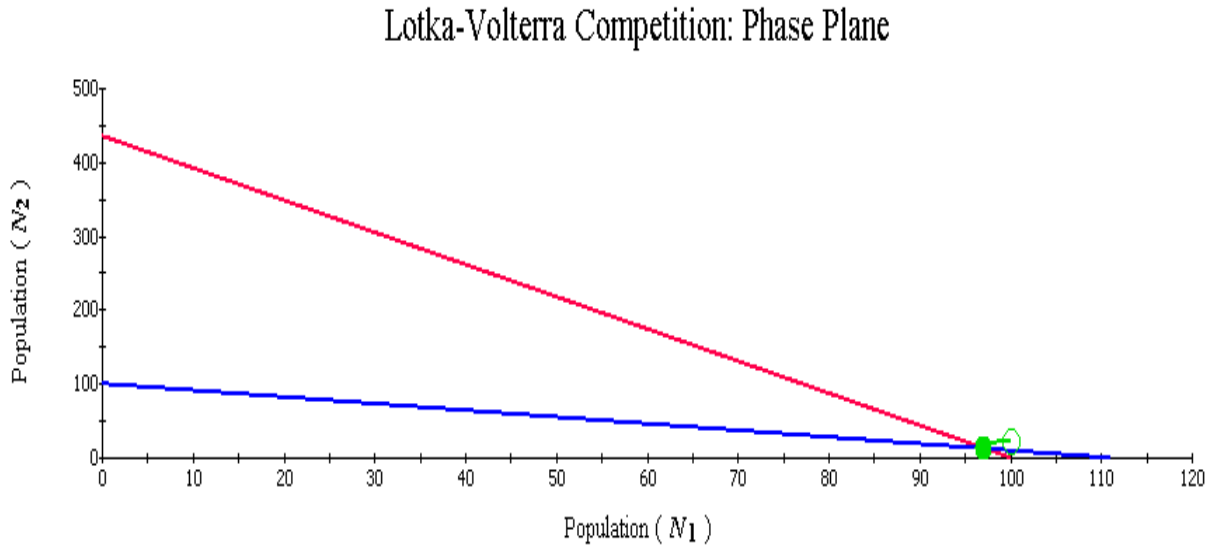


Fuente: Elaboración propia

Gráfico 23 *Curvas de competencia interespecífica PUNTO 2*



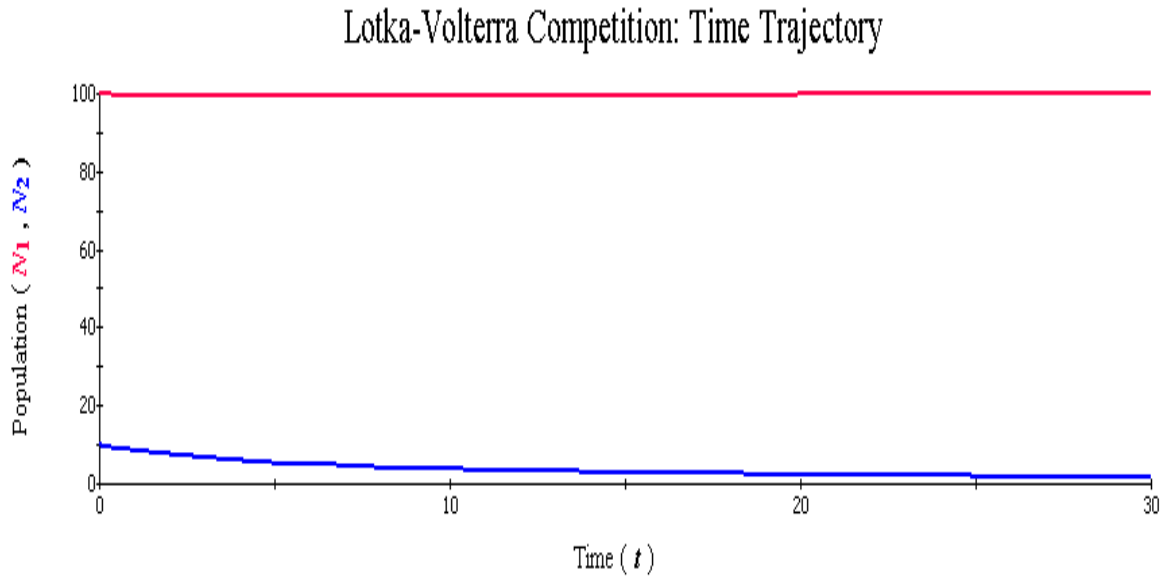
Fuente: Elaboración propia

Gráfico 24 Curvas de competencia interespecífica PUNTO 3

Fuente: Elaboración propia

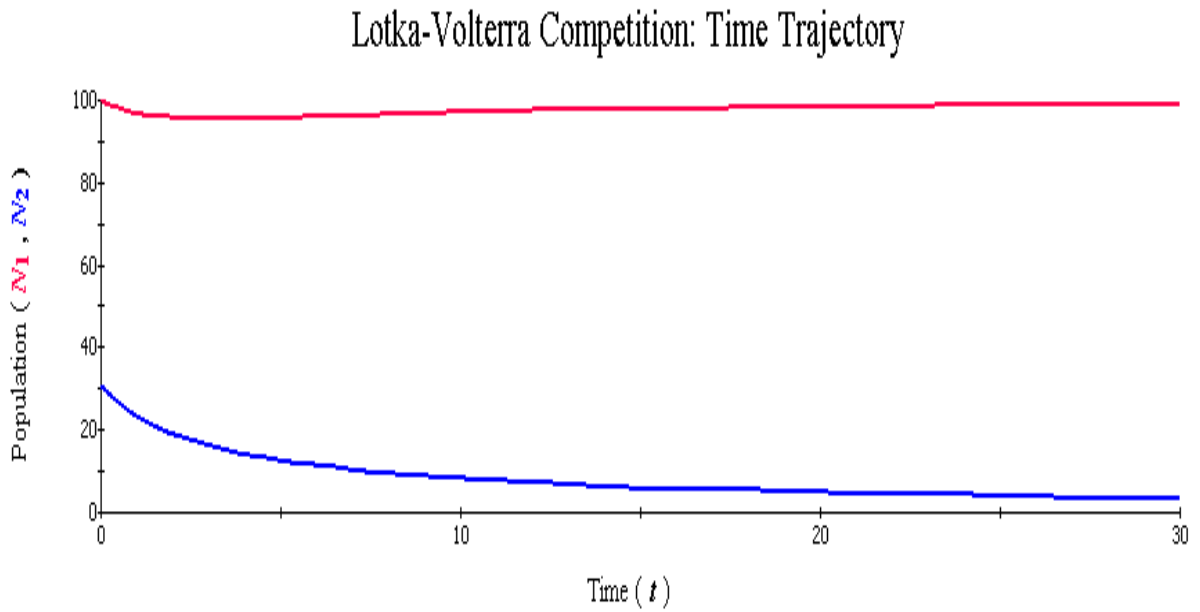
En los gráficos 22,23 y 24 de curvas de competencia interespecífica, muestran que en los puntos de muestreo 1 y 2 la densidad de *Chara Braunii* aumentó y la de *Microcystis aeruginosa* disminuyó, dándose una exclusión competitiva de *Microcystis aeruginosa*. El punto 3, registró una coexistencia estable entre ambas especies en la estación verano 3.

Gráfico 25 Trayectoria de crecimiento de Chara Braunii (N1) y Microcystis aeruginosa (N2), durante la estación verano PUNTO 1



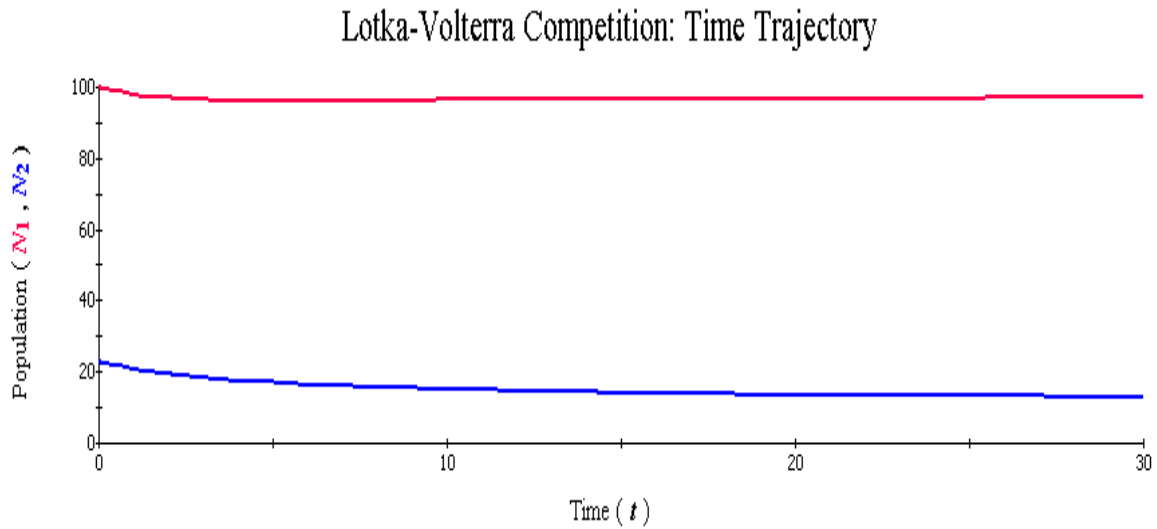
Fuente: Elaboración propia

Gráfico 26 Trayectoria de crecimiento de Chara Braunii (N1) y Microcystis aeruginosa (N2), durante la estación verano PUNTO 2



Fuente: Elaboración propia

Gráfico 27 Trayectoria de crecimiento de *Chara Braunii* (N1) y *Microcystis aeruginosa* (N2), durante la estación verano PUNTO 3

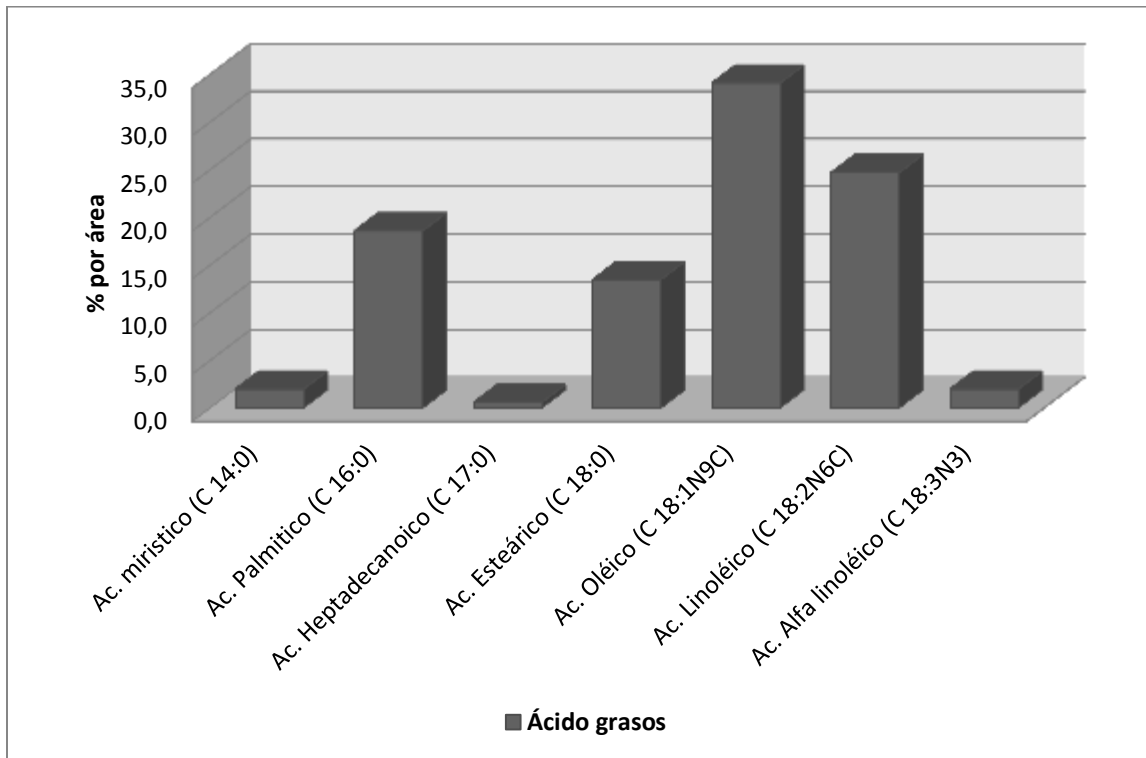


Fuente: Elaboración propia

Gráficos 25,26 y 27 de trayectoria de crecimiento de *Chara Braunii* (N1) y *Microcystis aeruginosa* (N2), durante la estación verano: demuestran que el crecimiento de *Chara Braunii* fue superior al de *Microcystis aeruginosa* en todos los puntos.

Composición química de ácidos grasos de *Chara Braunii*

Gráfico 28 Porcentaje de ácidos grasos en *Chara Braunii*



Fuente: Elaboración propia

El perfil de ácidos grasos mostró una dominancia de ácidos grasos saturados (SFA's); así como también se detectaron ácidos monoinsaturados (MUFA's), y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's). La composición de los mismos (Gráfico 28) indica un alto porcentaje de ácido oleico (C 18:1N9C), 34,1%, ácido linoléico (C 18:2N6C), 24,7%, ácido palmítico (C 16:0), 18,6%, ácido Esteárico (C 18:0), 13,5%, ácido α linoléico (C 18:3N3) y ácido mirístico (C 14:0) un 2,0%. En menor porcentaje se encontró el ácido Palmitoleico (C 16:1) 1,1 % y ácido Heptadecanoico (C 17:0) 0,6%.

Tabla 10 Porcentaje menor de ácidos grasos

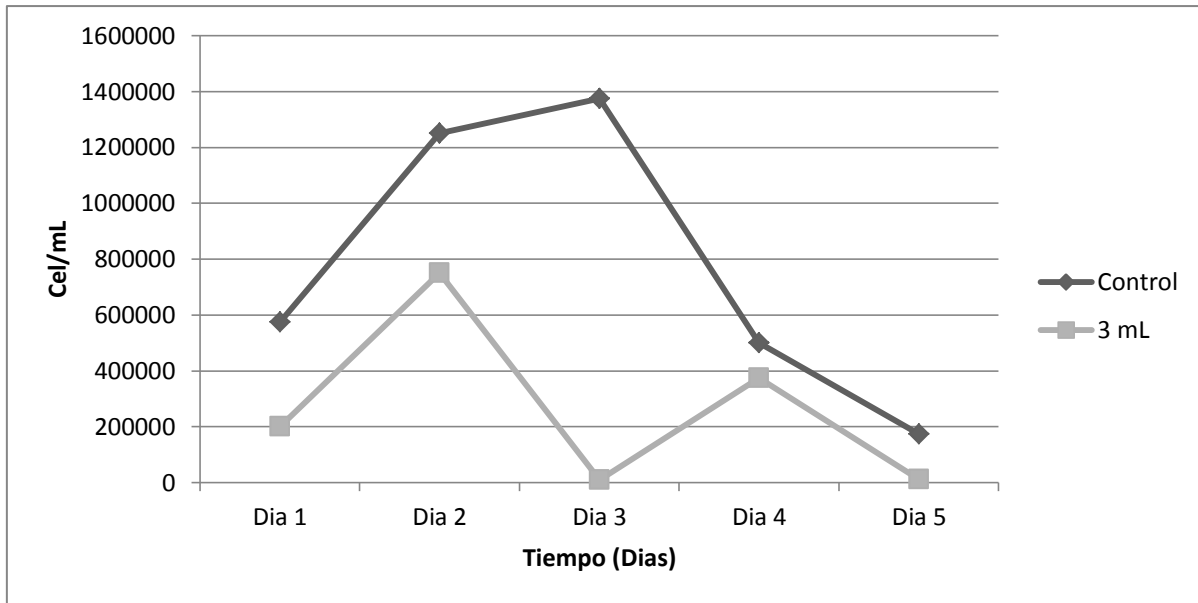
Ácido grasos	% área
Ac. Miristoleico (C 14:1)	<0,5
Ac. Heptadecanoico (C 17:1)	<0,5
Ac. Elaidico (C 18:1N9T)	<0,5
Ac. Translinoleico (C 18:2N6T)	<0,5
Ac. Gamma linoléico (C 18:3N6)	<0,5
Ac. Araquídico (C 20:0)	<0,5
Ac. Eicosadienoico (C 20:2N6)	<0,5
Ac. Eicosadienoico (C 20:3N3)	<0,5
Ac. Dihomo Gamma linolénico (C 20:3N6)	<0,5
Ac. Araquidónico (C 20:4N6)	<0,5
Ac. Eicosapentaenoico (C 20:5N3)	<0,5
Ac. Heneicosanoico (C 21:0)	<0,5
Ac. Behenico (C 22:0)	<0,5
Ac. Erúxico (C 22:1N9)	<0,5
Ac. Docosadienoico (C 22:2N6)	<0,5
Ac. Docosahexanoico (C 22:6N3)	<0,5
Ac. Tricosanoico (C 23:0)	<0,5
Ac. Lignocérico (C 24:0)	<0,5
Ac. Nervónico (C 24:1N9)	<0,5

Fuente:

El límite de cuantificación y detección fue de 0,5 %, entre los ácidos grasos analizados con porcentaje menor al límite de detección y cuantificación, se identificaron un total de 19 ácidos grasos con mayor dominancia de ácidos poliinsaturados y saturados (Tabla 9).

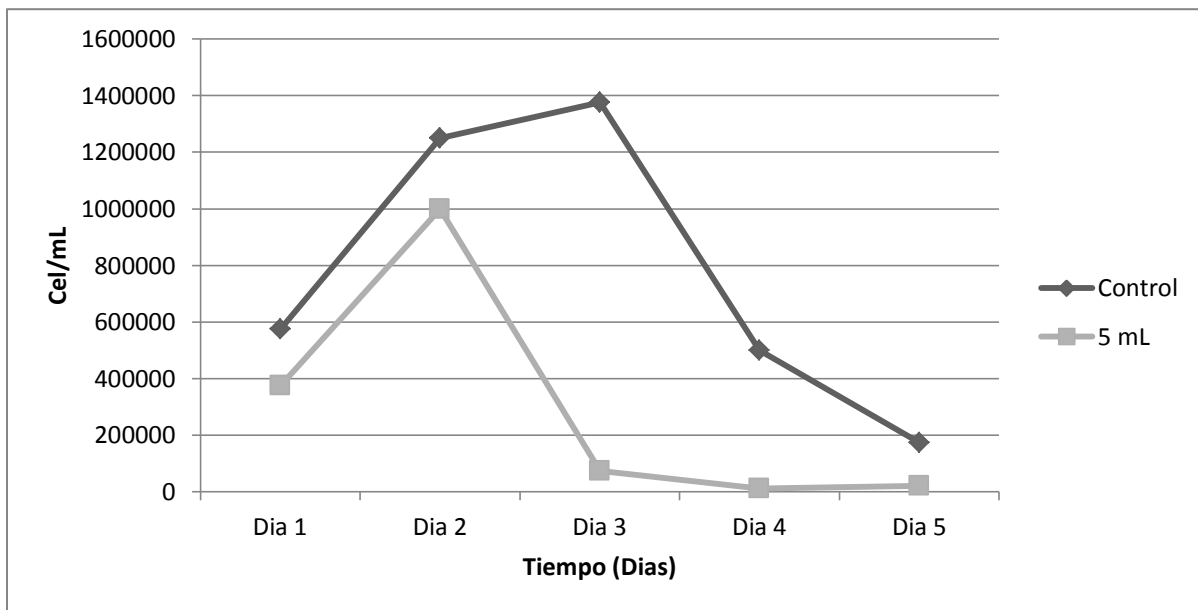
Prueba de inhibición

Gráfico 29 Concentración celular de *Microcystis aeruginosa* con la aplicación de 3 mL



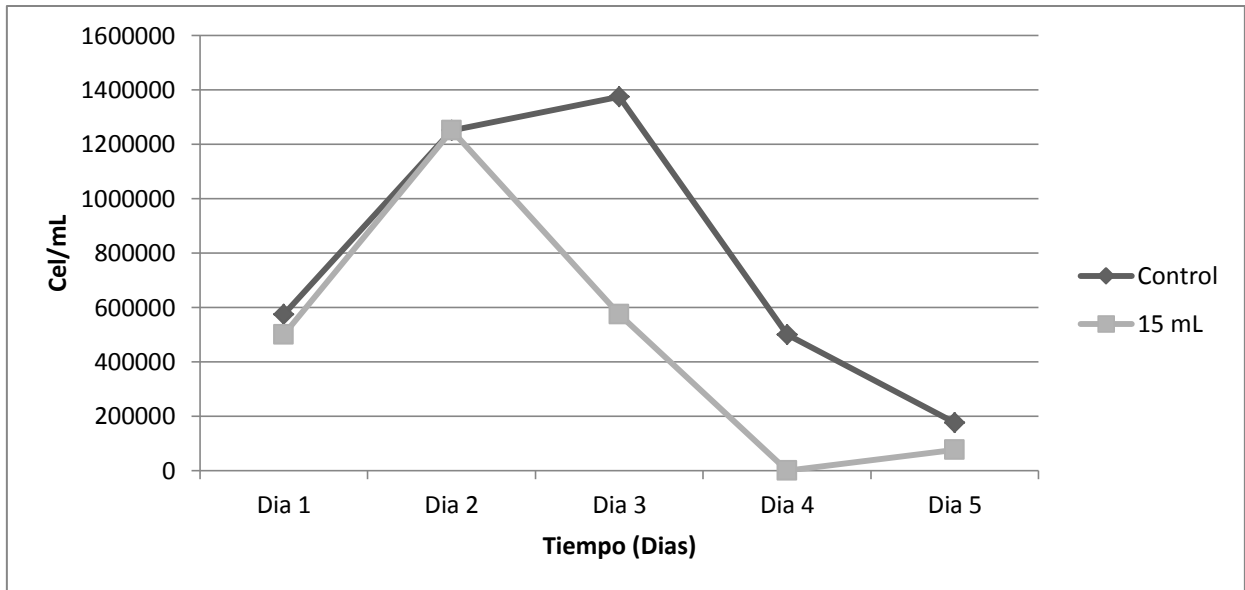
Fuente: Elaboración propia

Gráfico 30 Concentración celular de *Microcystis aeruginosa* con 5 mL del extracto de *Chara Braunii*



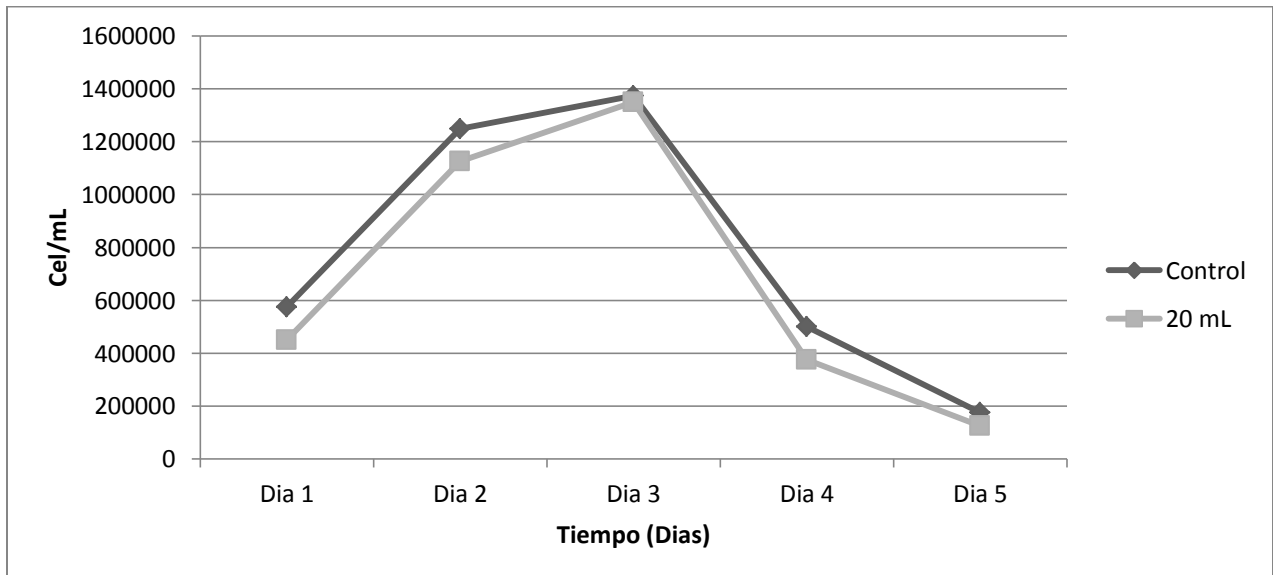
Fuente: Elaboración propia

Gráfico 31 Curva de crecimiento celular de *Microcystis aeruginosa* con 10 mL de esencia de *Chara Braunii Gmelin*



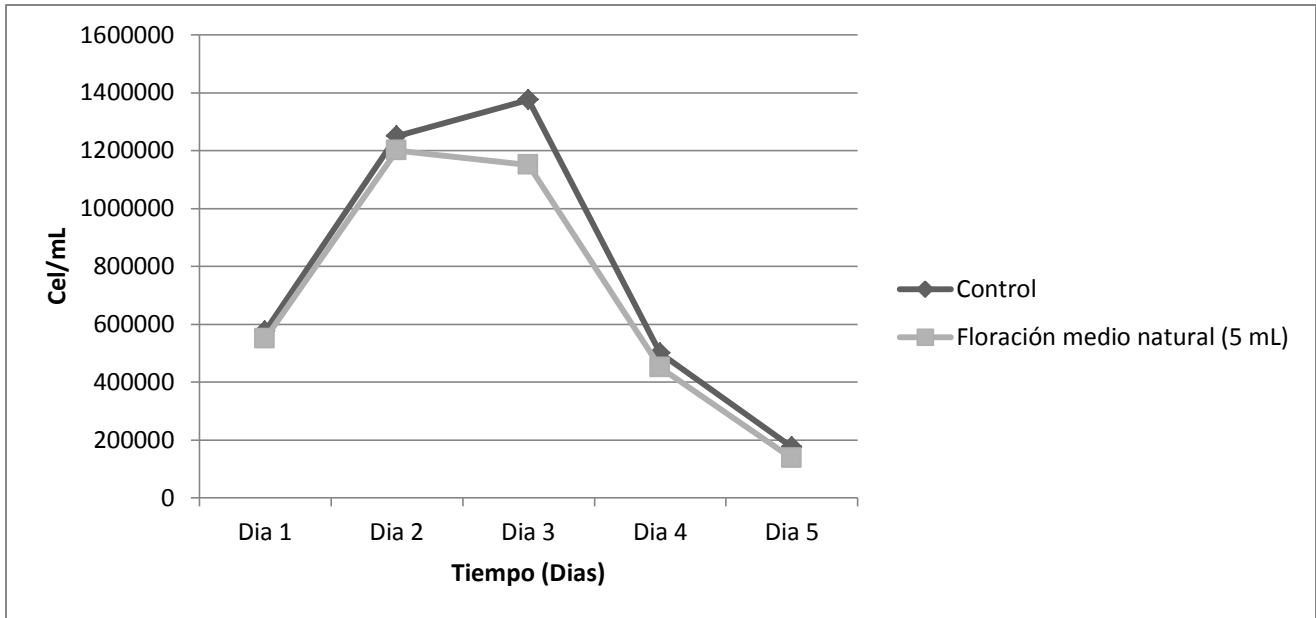
Fuente: Elaboración propia

Gráfico 32 Curva de crecimiento celular de *Microcystis aeruginosa* con 13 mL de esencia de *Chara Braunii Gmelin*



Fuente: Elaboración propia

Gráfico 33 Curva de crecimiento celular de *Microcystis aeruginosa* con 13 mL de esencia de *Chara Braunii* Gmelin



Fuente: Elaboración propia

En la pruebas de inhibición de la esencia de *Chara Braunii* se observó una disminución del crecimiento poblacional al 3er, 4to y 5to día en todas las dosificaciones aplicadas a los cultivos en relación al control (Gráficos 29 al 33). La máxima concentración celular del control fue de 1.375.000 Cel/mL y la mínima de 175.000 Cel/mL. Se destaca que el cultivo con dosis de 3 mL contó con la menor concentración celular con 750.000 Cel/mL de máxima y 10.000 Cel/mL de mínima; seguida del cultivo con 5 mL de esencia de *Chara Braunii* que contó con una máxima de 1.000.000 Cel/mL y una mínima de 12.500 Cel/mL; y el cultivo con 15 mL de dosificación de la esencia que contó con 1.250.000 Cel/mL de máxima.

*Rango de Inhibición**Tabla 11 Efecto inhibitorio (%) de extracto de Chara Braunii en cultivo de Microcystis aeruginosa 3mL*

Tiempo	3 mL (cel/mL)	IR (%)
Día 1	200000	-33,78
Día 2	750000	-59
Día 3	10000	-0,27
Día 4	375000	-74
Día 5	12500	-6,14

Fuente: Elaboración propia

Tabla 12 Efecto inhibitorio (%) de extracto de Chara Braunii en cultivo de Microcystis aeruginosa 5mL

Tiempo	5 mL (cel/mL)	IR (%)
Día 1	375000	-64,2
Día 2	1000000	-79
Día 3	75000	-4,45
Día 4	12500	-1,5
Día 5	22500	-11,85

Fuente: Elaboración propia

Tabla 13 Efecto inhibitorio (%) de extracto de Chara Braunii en cultivo de Microcystis aeruginosa 10mL

Tiempo	10 mL (cel/mL)	IR (%)
Dia 1	500000	-85,9
Dia 2	1250000	-99
Dia 3	575000	-40,8
Dia 4	0	1
Dia 5	75000	-41,85

Fuente: Elaboración propia

Tabla 14 Efecto inhibitorio (%) de extracto de Chara Braunii en cultivo de Microcystis aeruginosa 20mL

Tiempo	20 mL	IR (%)
Dia 1	450000	-77,2
Dia 2	1125000	-89
Dia 3	1350000	-97,18
Dia 4	375000	-74
Dia 5	125000	-70,4

Fuente: Elaboración propia

Tabla 15 Efecto inhibitorio (%) de extracto de *Chara Braunii* en cultivo de *Microcystis aeruginosa* FLORACION MEDIO NATURAL 5mL

Tiempo	Floración medio natural (5 mL)	IR (%)
Dia 1	550000	-94,6
Dia 2	1200000	-95
Dia 3	1150000	-82,6
Dia 4	450000	-89
Dia 5	137500	-77,5

Fuente: Elaboración propia

El rango indicó que hubo una inhibición máxima de entre 0,27-1 %, siendo los cultivos con 3mL, 5 mL y 10 mL los que presentan mayores rangos inhibitorios. El mínimo rango de inhibición resultó en la floración natural con la cual se utilizó 5 mL del extracto de *Chara Braunii* destilada con hexano (Tablas 10 al 14).

Tabla 16 Resultados del Análisis de Varianza para Cel/mL por DIAS

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>l</i>	<i>Medio Cuadrado</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2,10809E12		5,27022E11	5,15	0,0092
Intra grupos	1,43297E12	4	1,02355E11		
Total (Corr.)	3,54106E12	8			

Fuente: Elaboración propia

La tabla 15 muestra los resultados correspondientes al análisis de varianza para Cel/mL en función de los días. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Cel/mL entre uno y otro día, con un nivel del 95,0% de confianza.

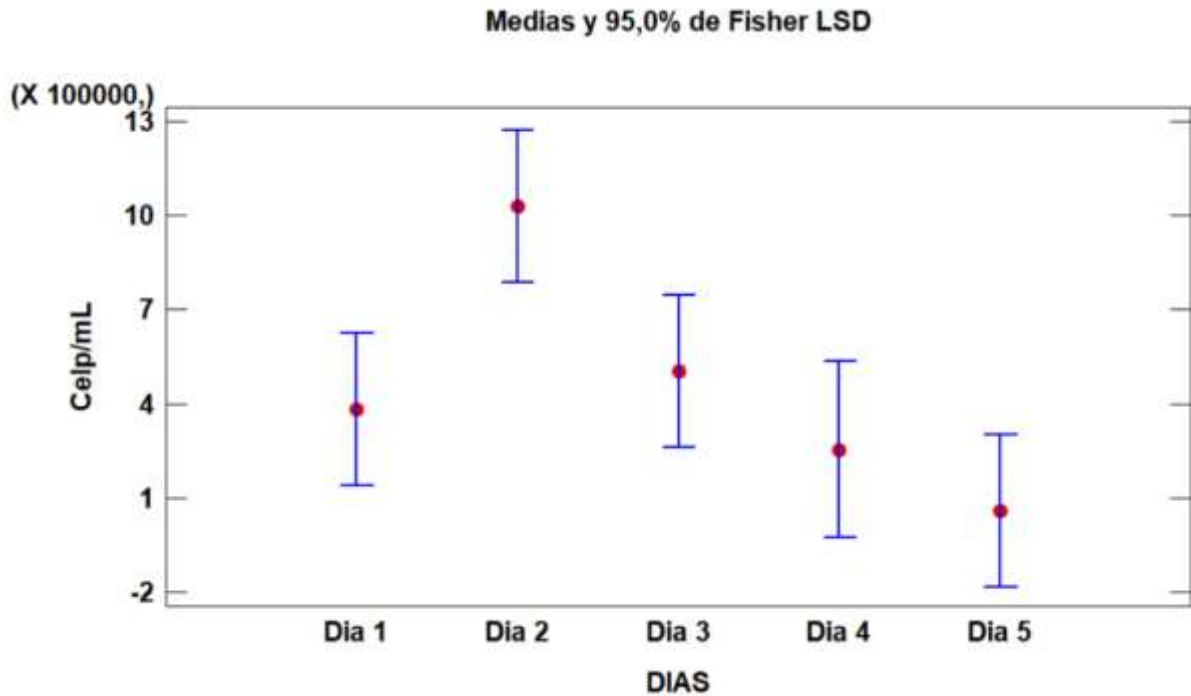
Para determinar cuáles medias o comparación de medias son significativamente diferentes de otras, se ha seleccionado Pruebas de Múltiples Rangos, cuyo resultado se aprecia en la Tabla 16.

Tabla 17 Pruebas de Múltiple Rangos para Cel/mL por DIAS. Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>DIAS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Día 5	4	58750	X
Día 4	3	254167	X
Día 1	4	381250	X
Día 3	4	502500	X
Día 2	4	1031250	X

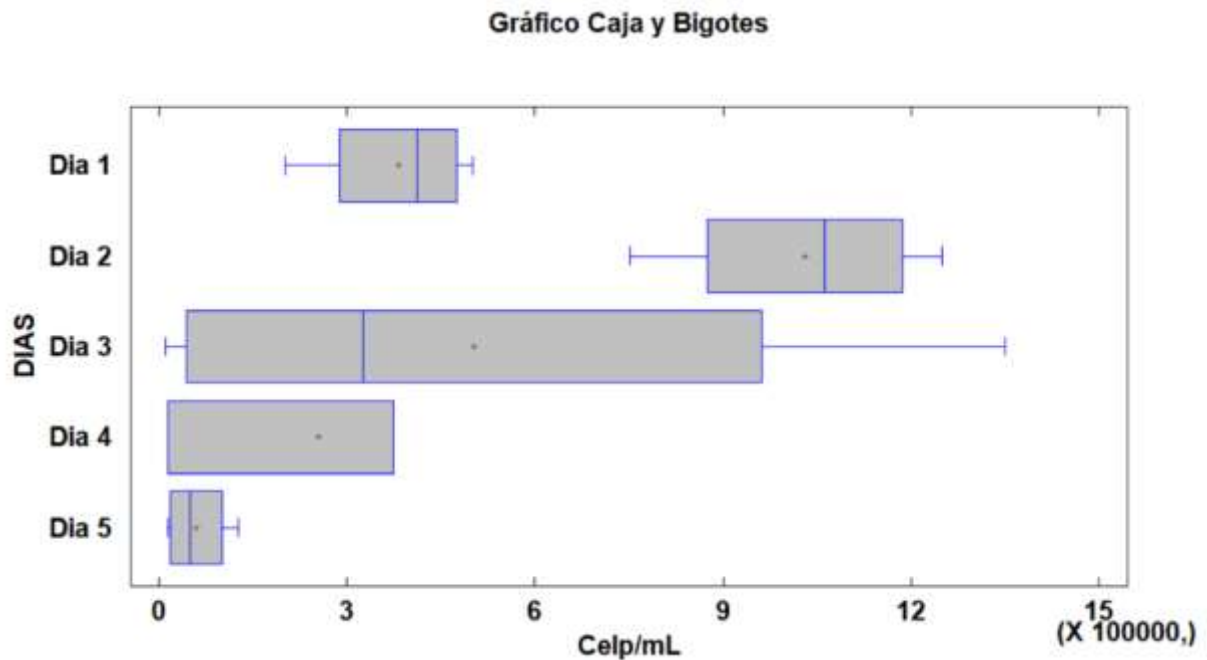
Fuente: Elaboración propia

La tabla 16 expone el método empleado para discriminar entre las medias, el cual es el procedimiento de diferencia mínima significativa conforme a la prueba de comparación de medias (LSD) de Fisher. Las marcas de la columna que corresponde a los grupos homogéneos muestran diferencias cuando no se encuentran alineados verticalmente. El día 5 muestra la menor cantidad de células por mL.

Gráfico 34 Gráfico del comportamiento de las medias de Cel/mL en función de días

Fuente: Elaboración propia

El gráfico 34 permite apreciar el comportamiento que experimentan la cantidad de células por mL en el transcurso de los días. Puede notarse que a partir del día 2 la disminución es notoria conforme a la prueba de comparación de medias de Fisher.

Gráfico 35 Gráfico de cajas y bigotes. Cel/mL según días

Fuente: Elaboración propia

El gráfico 35 representa el comportamiento de la cantidad de células por mL en función del transcurso de los días. Se puede notar que el día 5 es el que presenta menor cantidad de células y con un intervalo menor a los demás.

En síntesis, se rechaza la hipótesis de igualdad y se opta por la hipótesis alternativa. En este caso el día 2 difiere de todos los demás casos. Sin embargo la menor cantidad de células por mL se dio en el día 5, con una media muy inferior a las demás con $\bar{x} = 58750$.

*Análisis de varianza del factor dosificación para Rango inhibitorio como respuesta***Tabla 18 ANOVA para IR por DOSIS**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>l</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	8697,36		2899,12	3,43	0,0444
Intra grupos	12678,0	5	845,199		
Total (Corr.)	21375,3	8			

Fuente: Elaboración propia

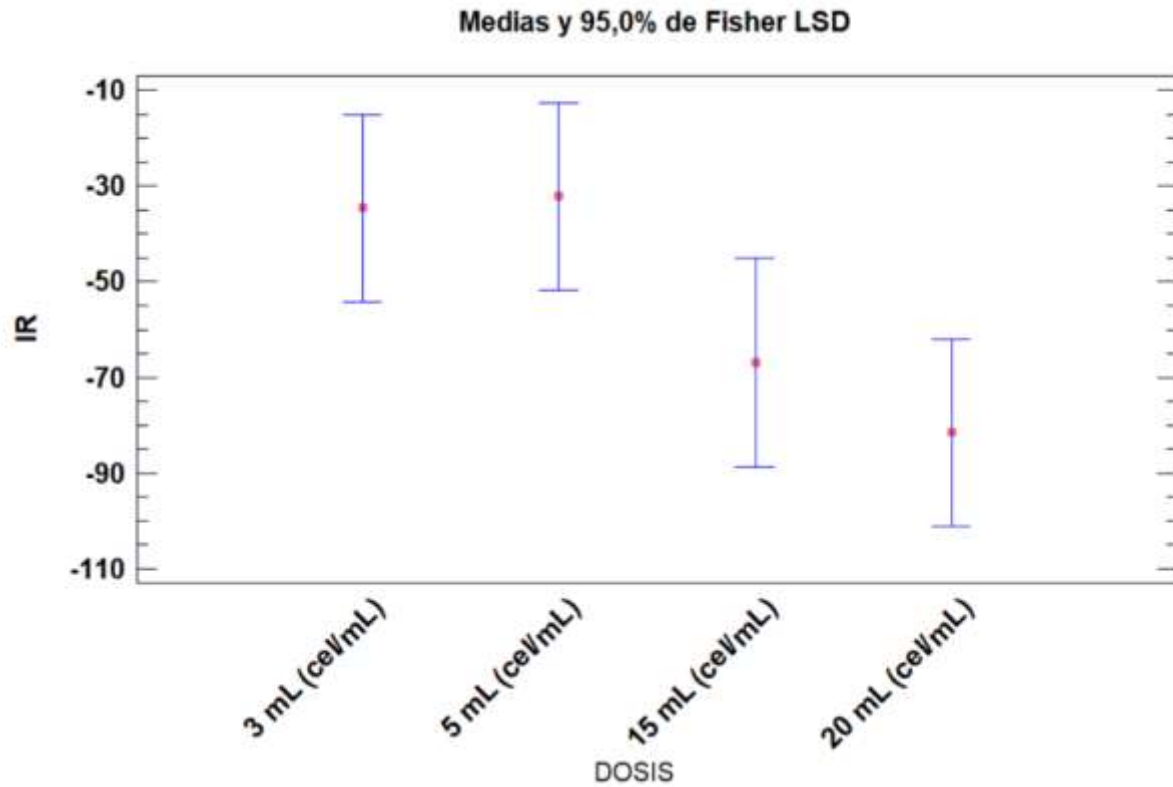
En la Tabla 17 que muestra la salida de resultados del análisis de varianza para el Rango Inhibitorio según las dosis del extracto de *Chara* y puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Rango Inhibitorio (IR) entre los niveles de la DOSIS, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 19 Pruebas de Múltiple Rangos para IR por DOSIS. Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>DOSIS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
20 mL (cel/mL)	5	-81,556	X
15 mL (cel/mL)	4	-66,8875	XX
5 mL (cel/mL)	5	-32,2	X
3 mL (cel/mL)	5	-34,638	X

Fuente: Elaboración propia

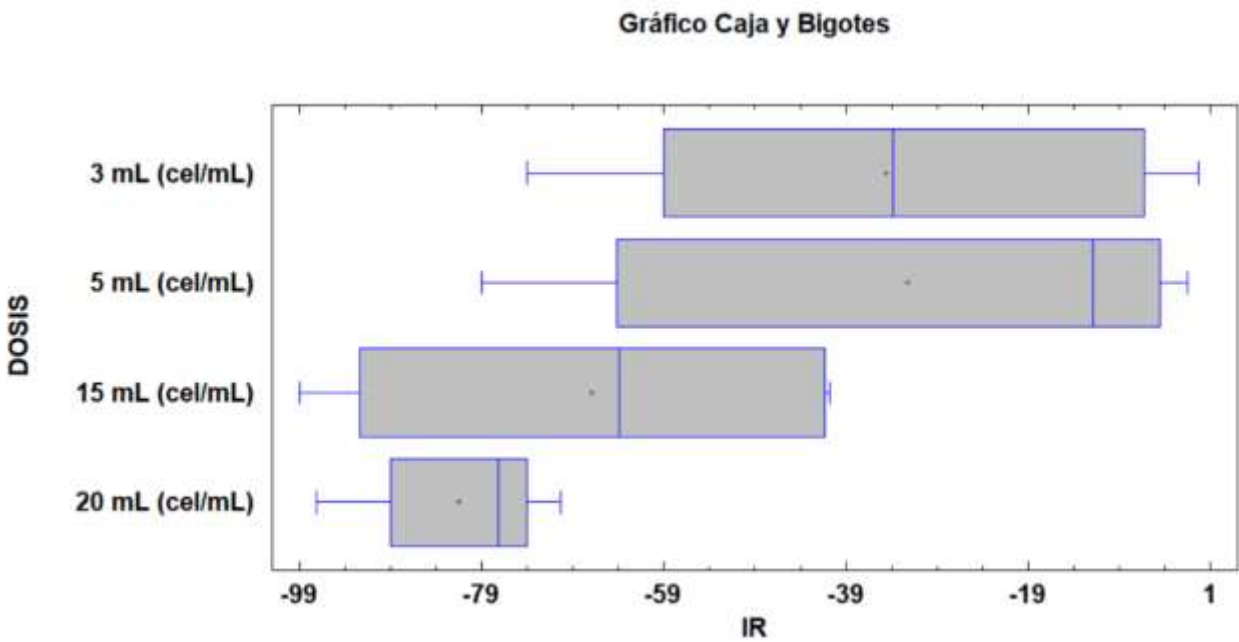
La tabla 18 expone la discriminación entre las medias del IR, mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Las marcas de la columna que corresponde a los grupos homogéneos muestran diferencias cuando no se encuentran alineados verticalmente. El mejor promedio se logró con la dosis de 20 mL mostrando diferencias significativas entre 5 y 3 mL.

Gráfico 36 Comportamiento de las medias de IR en función de dosis

Fuente: Elaboración propia

El gráfico 36 muestra el comportamiento de medias correspondientes a IR en función a la dosificación del extracto. La dosis 20 mL tiene el menor valor correspondiente a IR, el cual es de -81,556.

Gráfico 37 Gráfico de cajas y bigotes. Cel/mL según días



Fuente: Elaboración

El gráfico 37 representa el comportamiento los niveles de IR en función de la dosificación. Se aprecia que para 20 mL se obtuvo mayor rango inhibitorio e incluso con menor variabilidad.

Discusión de los resultados

Con relación al objetivo N°1 Analizar las condiciones ambientales del crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en cultivo aislado del medio natural, se concluye que el conteo de células proveyó de informaciones como concentración celular, curva de crecimiento intrínseco y tiempo de duplicación de la célula, en el cual el principal factor ambiental ha sido la temperatura. Aunque, según Paerl y Huisman (2008); Li et.al. (2012) existen diversos factores ambientales que influyen en el crecimiento o la aparición de cianobacterias en medios naturales como las altas temperaturas, alto pH, la habilidad para fijar nitrógeno atmosférico y la irradiación. El crecimiento de *Microcystis aeruginosa* del embalse Tacuary fue el similar al reportado por Gianuzzi et.al. 2016, con tasas de crecimiento de 0,31 y 0,33 día⁻¹, respectivamente, a 23 °C y un aumento del rango a 29°C. En el mismo se sugiere que la temperatura tiene un efecto significativo en el rango de crecimiento de *Microcystis aeruginosa* tratándose de especies aisladas de ecosistemas tropicales; y como se caracterizó en el medio natural, con 26°C y 28,9 °C, el embalse mantiene una alta temperatura en promedio anual, lo cual indica que podría darse una mayor presencia de floraciones de *Microcystis aeruginosa* en el mismo. Esta característica de la cianobacteria analizada indicaría una alta tasa de crecimiento de la misma dadas las condiciones ambientales referidas.

Esto se relaciona a lo mencionado por Forjan et. al.2008 y Robarts et.al 1987, sobre que la temperatura óptima para el desarrollo de estos *blooms* es de, aproximadamente, de 25°C. Así mismo, análisis realizados en floraciones del lago Ypacarai en diferentes estaciones han indicado una mayor presencia de *Microcystis aeruginosa* entre 25 °C a 33°C, en condiciones naturales (Benitez Rodas, et.al. 2017; Rodríguez et.al. 2005; Liu, 2011). Este comportamiento de la misma en lagos eutrofizados se acerca a la presentada por lacepa analizada en condiciones

laboratoriales. Según Li et.al.2012, a altas intensidades de luz y temperatura alcanzan un mayor rango de crecimiento específico.

Estos valores obtenidos fueron menores a los reportados por Lick (2004) quien informó valores de μ entre 0,52 a 0,54 día⁻¹ a mayor temperatura (18°C-32°C); y 0,44 día⁻¹ a 25°C. Watanabe et al. (1985), sin embargo a temperaturas mayores a 25 °C, la cepa analizada disminuyó su tasa de crecimiento manteniéndose constante con temperaturas entre 27,2°C y 28,1 °C, un comportamiento que difiere de los reportados en cultivos de la especie. Mientras que Crettaz et.al. (2017), informó de valores de μ entre 0,17 a 0,20 día⁻¹ a temperaturas entre 25 y 26 °C, Von Ruckert & Gianni (2004) informaron de un crecimiento de la especie entre 0,263 μ y 0,393 μ en condiciones de experimentales, los cuales se relacionan a los obtenidos con la cepa del embalse Tacuary.

Según varios autores (Robarts et.al. 1987; Hilt & Bakker 2016; Cobo 2012 y Alfaro 2014) la temperatura es una de las variables más importantes que controla el dominio taxonómico de cianobacterias en los medios naturales, actuando de forma sinérgica con otros factores. Así también, existe una estrecha relación entre la tasa de crecimiento y la producción de microcystina por parte de la células, a altas tasas de crecimiento mayor producción de microcystina en células pequeñas (Long et.al. 2001). Los resultados obtenidos fueron similares a el crecimiento tipo de células coloniales en laboratorio con un rango de 0,29 día⁻¹ (Li et al. 2012).

Las floraciones de cianobacterias del género *Microcystis aeruginosa* en embalses artificiales representan problemas sanitarios y ambientales de complejo manejo (Christoffersen & Kaas, 1999; Cobo, Bonilla et.al. 2015). Es de importancia analizar su interacción con otras especies teniendo en cuenta que la distribución y ensamblaje de las mismas en un ecosistema acuático

está fuertemente influenciado por el ambiente asociado. Entendiendo, según Roldán Pérez & Ramírez Restrepo (2008) que es el resultado de las interacciones de sus componentes, cobra interés el analizar esta interrelación entre estas dos especies dominantes en el embalse de manera a conocer su influencia en la presencia y distribución espacial de los mismos, y determinar la capacidad competitiva de *Chara Braunii* para su uso en el manejo de cianobacterias de este tipo. La interacción entre *Chara Braunii* y *Microcystis aeruginosa* indica que en el embalse la competencia puede tener una influencia determinante en la organización y estructura de este tipo de ecosistema, dándose la coexistencia en periodos fríos y la reducción de la población o exclusión competitiva de la cianobacteria de los espacios ocupados por ambas especies en los periodos cálidos (Marone, 1988, Tilman, 1987, Piñol & Martínez Vilalta, 2006). Durante las estaciones cálidas se generan estados de desequilibrio y por ende, la exclusión de *Microcystis aeruginosa*, conforme a lo expresado en la teoría del nicho, si dos especies superpusieran estrictamente sus nichos, una de ellas sería excluida por competencia (Volterra, 1926). Así también, el principio de exclusión competitiva menciona que especies con nichos idénticos compiten por los mismos recursos, por lo cual no permite su coexistencia.

No obstante, durante las estaciones frías se ha dado un equilibrio en el sistema, lo cual ha generado una coexistencia estable de ambas poblaciones, esta transición estacional entre coexistencia y exclusión podría deberse a la variaciones de sus densidades o bien a la dispersión espacial de las mismas, siendo esta agregación espacial en una comunidad la que favorece la competencia intraespecífica, aumentando la probabilidad de coexistencia (Marañón, 1991). Así mismo se entiende que el rango de distribución de una especie podría decrecer en presencia de otra con similares requerimientos.

A pesar de las densidades mayores de *C. Braunii* en relación a *Microcystis aeruginosa* han alcanzado un punto de equilibrio estable, lo cual conllevó a su coexistencia (Fariña et.al. 1997). Sin embargo, en las estaciones cálidas se observó un desequilibrio entre estas poblaciones, siendo el resultado la exclusión de *Microcystis aeruginosa* dónde se comprueba que, a través de la interacción competitiva que *C. Braunii* logra reducir el espacio ocupado por *Microcystis aeruginosa* en el medio, hasta lograr su exclusión (Tilman, 1987). Siendo las macrófitas competidoras exitosas en el medio, por su capacidad de aprovechamiento de nutrientes de sedimentos, tratándose de macrófitas enraizadas (Van Dock & Van de Bund, 2002). Estas ventajas competitivas de una especie sobre otra permiten que la misma tome los sitios en el sistema (Pianka, 1981).

Los resultados, durante la estación verano, demostraron que esta capacidad de competición de *C. Braunii* podría regular la densidad poblacional de *Microcystis aeruginosa* en el embalse. El retroceso de la cobertura espacial o dispersión de *Microcystis aeruginosa* es una explicación clara de que el concepto del espacio en la dinámica de poblaciones es de gran importancia (Margalef, 1991; Bascompté & Solé, 2005), evidenciándose la influencia de una especie sobre otra.

Considerando que *C. Braunii* puede competir y generar una mayor dispersión espacial de *Microcystis aeruginosa*, sobretodo en las estaciones cálidas en las que desplazan a *Microcystis aeruginosa* del medio reduciendo esta manera la superficie de cobertura. Esto concuerda con su mayor capacidad en el uso y aprovechamiento de los recursos (Qiu et.al.1998, Van Donk & Van Bunk, 2002). Lo anterior, siendo *Microcystis aeruginosa* una especie de mayor densidad poblacional en corto tiempo considerando su ciclo de vida, el resultado ha demostrado que la coexistencia no está determinada únicamente por la especie dominante numéricamente, sino

condicionada asimismo por la estructura espacial o bien competitividad espacial (Marañón, 1991); debido a que *C. Braunii* presenta mayor área de cobertura espacial por sus características morfológicas.

A razón de que la evidencia fue analizada en condiciones naturales, el modelo de lokta volterra podría generar ciertos sesgos debido a que el mismo considera únicamente las densidades poblaciones (N) de especies competidoras que puedan albergar un espacio (K) teniendo en cuenta su rango de crecimiento (r). No obstante, los resultados evidencian competencia interespecífica entre ambas especies, lo cual reduce la población de la cianobacteria en el embalse debido a la exclusión competitiva o mayor dispersión espacial, teniendo una gran influencia durante las estaciones cálidas.

Conocer esta interacción en embalses tropicales puede tener utilidad en el manejo de floraciones algales del género *Microcystis aeruginosa* siendo la competencia por el espacio un factor clave. La aplicación del modelo considerando la cobertura espacial, ha sido un reto para la investigación dadas las brechas existentes entre ambas especies en cuanto a características morfológicas. La naturaleza espacial de los ecosistemas condiciona muchos de sus patrones y dinámicas, en ese sentido permite comprender los procesos ecológicos a través de nuevas perspectivas y herramientas (Zavala *et al.* 2006; Ledo *et.al.* 2013), como la coexistencia entre especies similares (Velázquez *et.al.*2007) o la exclusión competitiva de otras (Piñol & Martínez Vilalta, 2006).

Con relación al objetivo específico N°2, Analizar la composición química de ácidos grasos de la macroalga *Chara Braunii*, se estima que las macrófitas acuáticas son capaces de suprimir el crecimiento de fitoplancton a través de la excreción de sustancias químicas que inhiben el crecimiento del fitoplancton (Hutchinson, 1975; Bauer, 2011; Gao, 2011; Chen *et al.*, 2012). Las

mismas tienen efectos positivos sobre el zooplancton y negativos en el fitoplancton (Van Donk, 2002). Por ello, fue importante conocer más a fondo las propiedades de la especie de carófito en estudio para inferir sus componentes alelopáticos, debido a que no todas las especies presentan las mismas propiedades.

Según Mundt et al. (2004), los ácidos grasos tendrían capacidad bactericida debido a que son capaces de cambiar la permeabilidad de la celda membrana, interactuar con proteínas y lípidos de la membrana celular, inhibir enzimas especiales o formar una capa alrededor de las celdas. Asimismo, Ikawa et al. (2004) indicó que la actividad inhibidora se debe a sustancias lipoides presentes en los PUFA's (ácidos grasos poliinsaturados). Reinikainen et al. (2001) hallaron que los PUFA's tienen propiedad de alta toxicidad. Murakami et al. (1990a) y Yamada et al. (1993), Han encontrado que los componentes con principal actividad inhibitoria en la especie *Phormidium tenue* provinieron de la fracción de ácido graso libre, cuyos componentes principales fueron linoleico (C18: 2) y linolénico (C18: 3). Los ácidos grasos podrían tener efecto detergente en las bacterias (Debois et al. 2001), así como ocasionar lisis celular con lo cual inhibe el crecimiento de las mismas (McCracken et al. 1980; Ni et al. 2015)

Con el análisis de la composición química de ácidos grasos se detectó que la macroalga *Chara Braunii* presente en el embalse Tacuary, contiene un alto porcentaje de ácidos grasos C18 como son el de ácido oleico (C 18:1N9C), ácido Linolénico (C 18:2N6C), ácido Esteárico (C 18:0) así como ácidos grasos C16 como el ácido palmítico (C 16:0). Según Debois et al. (2010), las actividades biológicas de los FFA tienen un papel en las defensas del huésped frente a potenciales microorganismos patógenos u oportunistas. Un aspecto importante de esto es la inhibición o muerte directa de bacterias. En sí, los ácidos grasos, particularmente los PUFA's (polinsaturados) tienen efectos tóxicos y ecológicos en el ambiente (Ikawa, 2004).

De igual manera, Mundt et al. (2004) reportó a los ácidos grasos en especial al ácido α -linolenic (α C18:3) como antibacterial. Y Kamaya et al. 2003, demostró una alta toxicidad del ácido oleico sobre el crecimiento algal de *Selenastrum capricornutum*, afirmando que la posición del doble enlace como la configuración que afectan la toxicidad.

Wu et al. (2006) detectó que los ácidos grasos C18, incluyendo OA, LA y LNA, tienen efectos tóxicos sobre el fitoplancton, siendo mayor en los ácidos α -linolenic (α C18:3).

Se dedujo que existe una correlación positiva entre el grado de lisis celular y la toxicidad de los ácidos grasos. Chiang et al. (2004) ha analizado la toxicidad de los ácidos grasos, hallando que los ácidos oleico y α -linolénico procedentes de una clorófita tienen un potencial efecto tóxico sobre el fitoplancton, así como el zooplancton.

Un 34% de los compuestos de ácidos grasos analizados corresponden al ácido linoleico. Según Ni et al. (2015), utilizando microesferas de liberación sostenida del ácido linoleico se pudo inhibir el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* al estado de no crecimiento. Considerando que uno de los ácidos grasos con mayor porcentaje en *C. Braunii* ha sido el ácido linoleico se puede inferir que este compuesto pudo ejercer alelopatía en el cultivo de *Microcystis aeruginosa*.

Algunos autores (Wu et al. 2006; Alamsjah et al. 2007) indicaron que existe una la alta toxicidad de los ácidos grasos, siendo el ácido alfa linoelico el de más alta toxicidad, esto debido a que inhiben el transporte de electrones secundario en Fotosistema II a través del desplazamiento de quinona endógena a partir de péptidos de unión a quinona según Warden & Csatorday (1987). Siendo confirmada la actividad inhibitoria para los ácidos linolenico y linoleico, esto refuerza la teoría de que los ácidos linoleico y alfalinoelico podrían ser los compuestos de mayor alelopatía presentes en la especie *C. Braunii*.

A las teorías sobre la alelopatía, Berger & Schagerl (2003) y Rodrigo et al. (2015), han comprobado que sistemas dominados por carófitos durante mucho tiempo han presentado un efecto negativo sobre el fitoplancton, esto se ha atribuido a la alelopatía. Infiriendo que las characeas excretan sustancias que influyen en el crecimiento de otras algas, ya sea directamente en coexistencia en el ambiente o a través de la interacción con bacterias; es decir actividad antibacterial en particular se ha estudiado mayormente las especies *Chara vulgaris* (Zhang et al. 2009; Cai et al. 2013) , *Chara hispida* (Rodrigo et al. 2015), así también *C. Braunii* presenta inhibición o actividad fungicida de hasta un 78% en especies como *Aspergillus Flavus* conforme a trabajos experimentales sin haberse aún determinado que compuestos de la macroalga podrían ejercer la toxicidad (Khalid et al. 2015). Los efectos alelopáticos de las macrófitas sumergidas han sido demostrados en más de 37 especies, en muchos se desconoce cuáles serían los compuestos (Bauer, 2011; Hilt et al. 2008).

Los resultados obtenidos del análisis de *C. Braunii*, donde los ácidos grasos presentes en mayor porcentaje son considerados como inhibidores o antibacteriales, se podría deducir que estos componentes de la macroalga son los que podrían ejercer alelopatía sobre *Microcystis aeruginosa*, principalmente los ácidos linoleico, alfa linoleico y oleico.

En relación al objetivo específico N°3, determinar el efecto inhibitorio del extracto de *Chara Braunii* en diferentes concentraciones sobre un cultivo de *Microcystis aeruginosa*, con el análisis de varianza y prueba a posteriori realizado a los resultados de concentración celular de *Microcystis aeruginosa* en función de los días de experimentación, se determinó que hubo una reducción de las mismas en el 5to. día con una media muy inferior a las demás con $\bar{x}= 58750$.

De igual manera, el comportamiento de medias correspondientes a IR (Rango inhibitorio) en función a la dosificación del extracto demostraron que la dosis 20 mL tiene el menor valor correspondiente a IR, el cual es de -81,556. Con la misma se obtuvo un rango inhibitorio mayor e incluso menor variabilidad. De esta manera, los resultados de pruebas dosificadas del extracto de *C. Braunii* realizado por arrastre de vapor de agua, indicaron la existencia de inhibición en el crecimiento del cultivo de *Microcystis aeruginosa* de hasta un 95% de confiabilidad.

Los resultados obtenidos por Zhang et al. (2009), aplicando ácidos grasos aislados de *Chara vulgaris* a diferentes densidades de *Microcystis aeruginosa* indicaron hasta un 70% de inhibición al 5to día de experimentación a una densidad media, de igual manera a medida que pasaron los días la inhibición aumentó.

Algunos autores (Zhang et al. 2009; Berger&Schargel (2004), los extractos realizados con metanol han dado mejores resultados que los acuosos. Sin embargo, en contraposición a esto, en la experimentación realizada los extractos acuosos obtuvieron mejores resultados que la prueba realizada con hexano como solvente.

Otros estudios utilizando extractos de macrófitas acuáticas como *Myriophyllum spicatum* L., *Ceratophyllum demersum* L., *Elodea canadensis* Michx, *Egeria densa* Planch. Han sido desarrollados en países Europeos así como en Brasil. Las mismas demostraron inhibir el crecimiento de distintas especies de cianobacterias como *Microcystis aeruginosa* y *Anabaena*, hallándose variaciones en los compuestos que podrían generar la inhibición del fitoplancton, tal es el caso de los polifenoles exudados por estas macrófitas acuáticas, en experimentos de coexistencia entre la planta y el cultivo (Gross et al. 2007; Gao et al. 2011; Hilt & Gross, 2008); así también conforme a experimentos de coexistencia entre *Egeria densa* y *Microcystis aeruginosa* se ha hallado el aumento de compuestos fenólicos totales de *Egeria* que inhibían el

crecimiento de *Microcystis aeruginosa* (Amorim, 2016). Tratándose de carófitos, estos han demostrado tener efecto alelopáticos sobre el fitoplancton en el medio natural (Rodrigo et al. 2015), según Zhang et al. (2009), la especie *Chara vulgaris* contiene ácidos grasos ortodecanoicos que ejercen inhibición sobre determinada concentración de *Microcystis aeruginosa*. Algunos compuestos alelopáticos como el ditiolano y tritiane fueron aislados de *Chara globularis* para su análisis, hallándose su efecto sobre el fitoplancton en especial sobre las diatomeas y fitoplancton epifitos (Wium-Andersen et al. 1981)

En el medio natural se reportaron casos de alelopatía en el 3% y 100 % de cobertura de macrófitas de otras especies, esto indica que no necesariamente debe haber gran concentración de biomasa para que la liberación de los compuestos alelopáticos sea efectiva.

Aunque muchos mecanismos estén envueltos en la relación entre el fitoplancton y las macrófitas; este ha demostrado ser sensible a los aleloquímicos sobretodo las cianobacterias por sobre otros géneros (Jasser, 1995; Lürling et al. 2006; Pakdel et al. 2013; Rodrigo et al. 2015)

Los mismos influyen negativamente en el crecimiento y en los procesos fisiológicos, como las actividades enzimáticas y la fotosíntesis (Zhang et al. 2009; Addisie, 2012; Amorim, 2016).

Según Cheng et al. (2008), la ficobiliproteína sería el objetivo de la inhibición alelopática de la especie *Myriophyllum aquaticum* en *M. aeruginosa*. No obstante, el mecanismo de inhibición del crecimiento de aleloquímicos de macroalgas y macrófitas depende de la naturaleza de la sustancia química provocada y genotipo y diversidad (Addisie, 2012)

Los compuestos con mayor potencial alelopático hallados en otras especies de regiones frías o marinas, como *Ceratophyllum demersum* o *Myriophyllum spicatum*, han sido polifenoles, Y en *Chara globularis* han sido compuestos de azufre elemental. Según Berger & Schargel (2004), la bioactividad de los carófitos contra las cianobacterias es más fuerte en las especies *Chara*

aspera, *Chara globularis*, *Nitellopsis obtusa* y *Nitella Gracilis*; sin embargo, no se cuentan con antecedentes de carófitos de regiones tropicales considerando la gran variación entre características ambientales de la especie, y por ello, de su composición, de igual manera pocos experimentos con iguales características a esta investigación se han desarrollado a nivel mundial y regional.

No obstante, infiriendo en los resultados obtenidos se pudo comprobar la existencia de compuestos alelopáticos en la especie *Chara Braunii* que son capaces de inhibir el crecimiento poblacional de *Microcystis aeruginosa*.

Conclusiones

En relación al objetivo general de analizar el efecto inhibitorio del extracto de la *Chara Braunii* sobre el crecimiento poblacional *Microcystis aeruginosa* en condiciones de laboratorio, se concluye que del muestreo e identificación de las especies de carófito y cianobacteria del embalse Tacuary de Carmen del Paraná, se identificaron a las especies *Chara Braunii* y *Microcystis aeruginosa*

A través del análisis experimental del cultivo se determinaron condiciones del crecimiento de *Microcystis aeruginosa* a nivel laboratorial, considerando a la temperatura como una de las variables a la que es más susceptible la especie se concluye que la temperatura óptima para una alta tasa de crecimiento de la misma fue de 23 °C, y se destaca que esta variable tuvo mucha influencia en la tasa de crecimiento del cultivo analizado, considerando que las variables como nutrientes, luz, pH y oxigenación fueron controladas en la experimentación.

Del análisis de composición química de ácidos grasos presentes en *Chara Braunii* se determinó que la misma tiene un mayor porcentaje de ácidos de cadena C18, entre los cuales se destacan el ácido oleico (C 18:1N9C) con 34,1%, ácido linoléico (C 18:2N6C) con 24,7%, ácido palmítico (C 16:0),18,6%, ácido Esteárico (C 18:0),13,5%, ácido α linoléico (C 18:3N3). Teniendo en cuenta los antecedentes tóxicos de estos compuestos sobre las cianobacterias se podría deducir que estos son los componentes alelopáticos de la especie analizada.

A través de la prueba de inhibición del extracto de *Chara Braunii* sobre el crecimiento poblacional de *Microcystis aeruginosa*, utilizando concentraciones mínimas y máximas, se determinó a través del análisis de varianza sobre el rango inhibitorio, que hubo inhibición del crecimiento de la cianobacteria con la máxima concentración aplicada de 20 mL, determinándose que hubo una mayor disminución de la concentración celular al 5to. día de experimentación.

Por ello, los resultados nos permiten aceptar la hipótesis de que el extracto de *Chara Braunii* inhibe el crecimiento poblacional del cultivo de *Microcystis aeruginosa*, esta actividad alelopática se debería a los ácidos grasos de la cadena C18 presentes en mayor porcentaje en *C. Braunii*, así mismo, se determinó que a mayor concentración aumenta el efecto inhibidor. De igual manera en campo, el modelo de competición determinó que *C. Braunii* ejerció mayor competitividad reduciendo las colonias de *Microcystis aeruginosa*

Estos resultados aportan nuevos conocimientos sobre las propiedades de la especie de carófito analizado. Asimismo, se concluye que la misma podría ser una nueva herramienta para el manejo de floraciones algales tóxicas a nivel nacional o regional.

Recomendaciones

Tras los resultados obtenidos, se recomienda realizar investigaciones sobre los ácidos grasos presentes en la especie *C. Braunii*, a través de su aislamiento de la planta y prueba de manera a determinar cuál es el ácido graso con mayor efecto inhibitorio sobre *Microcystis aeruginosa*.

Así también, se recomienda realizar monitoreos de macrófitas y cianobacterias presentes en el embalse Tacuary de Carmen del Paraná, para prevenir posibles riesgos de floraciones algales de mayor cobertura. Sería de importancia científica realizar un inventario de la flora acuática de los embalses al ser ecosistemas de reciente formación, a las propiedades fitoremediadoras de algunas plantas acuáticas, como bioindicadores y así también, determinar especies nativas e invasoras en la misma.

De manera particular, se recomienda a las instituciones encargadas, no remover excesivamente la biomasa de *C. Braunii* del embalse Tacuary, debido al efecto que las mismas ejercen en la mejora de la calidad del agua.

Como la investigación ha sido a nivel experimental, se recomienda el desarrollo de una investigación en zonas con problemas de floraciones algales con *Microcystis aeruginosa*, en la cual se pueda emplear la macroalga con un sistemas de humedal artificial y evaluar su efecto sobre el biovolumen de las floraciones.

Lista de Referencias

- Álvarez Cobelas, M., Muñoz Ruiz, P., & Rubio, A. (1991). La eutrofización de las aguas continentales españolas. *Henkel Ibérica, S.A.*
- Álvarez, M. R., Meléndez, L. A., & Cosío, S. M. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste*, 15-17.
- Amorim, C. A. (2017). Efeitos alelopáticos mútuos entre a macrófita aquática *Egeria densa* Planch. e a cianobactéria formadora de florações *Microcystis*.
- Arredondo Vega, B. O., & Voltolina, L. D. (2007). *Manual: Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.(CIBNOR).
- Bakker, E. S., & Hilt, S. (2016). Impact of water-level fluctuations on cyanobacterial blooms: options for management. *Aquatic ecology*, 485-498.
- Berger, J., & Schagerl, M. (2004). Allelopathic activity of Characeae. . *BIOLOGIA-BRATISLAVA*, 9-16.
- Bicudo, R. M. (1972). *Género Chara (Charophyceae) no Brasil*). Doctoral dissertation, Universidade de Sao Paulo. Instituto de Biociências.
- Bonilla, S. (2009). Cianobacterias planctónicas del Uruguay. . *Manual para la identificación y medidas de monitoreo*. Montevideo: UNESCO. PHI-VII (Documento técnico, 16). ISBN: 978-92-9089-138-3.
- Bonilla, S., Kruk, C., De León, L., Vidal, L., & Brena, B. (2009). Medidas de gestión y sistemas de vigilancia. 27-33.

- Braun-Blanquet, J. (1932). *Plant sociology. The study of plant communities. Plant sociology. The study of plant communities. First ed.*
- Calero, S., Colom, W., & Rodrigo, M. A. (2015). The phenology of wetland submerged macrophytes related to environmental factors. *Limnetica*, 425-438.
- Cascante, A. (2008). *Guía para la Recolección y Preparación de muestras botánicas.* . San José. Costa Rica.: Herbario Nacional (CR), Museo Nacional de Costa Rica, .
- Cassis, D., Muñoz, P., & Avaria, S. (2002). Variación temporal del fitoplancton entre 1993 y 1998 en una estación fija del seno Aysén, Chile (45°26'S 73°00'W). . *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43 - 65.
- Cirujano, S., Cambra, J., Sánchez Castillo, P., Meco, A., & Flor Arnau, N. (2008). Flora ibérica. Algas continentales. Carófitos (Characeae) .
- Cobo, F., Lagos, L., Barca, S., Vieira, R., & Servia, M. (2012). Cianobacterias y medioambiente. Aspectos ecotoxicológicos de sus floraciones en aguas continentales. En F. d. Coruña, *Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología* (pág. 136).
- Dale, H. M. (1981). Hydrostatic pressure as the controlling factor in the depth distribution of Eurasian watermilfoil, *Myriophyllum spicatum* L. . *Hydrobiologia*, 239-244.
- De León, L. (2002). Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: causas y consecuencias. . *Perfil Ambiental del Uruguay*, , 28-37.
- Domis, L. N., Mooij, W., & Huisman, J. (2007). Climate- induced shifts in experimental phytoplankton community: a mechanistic approach. *Hidrobiologia*, 403-413.
- Forján Lozano, E., & et.al. (2008). (2008) Cianoalerta: estrategia para predecir el desarrollo de cianobacterias tóxicas en embalses. *Ecosistemas 17*, 37-45.

- Giannuzzi, L., & at.al. (2016). Growth, toxin production, active oxygen species and catalase activity of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) exposed to temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology*, 22-30.
- Gross, E. (1999). Allelopathy in benthic and littoral areas: case studies on allelochemicals from benthic cyanobacteria and submerged macrophytes. In: Inderjit Dakshini, K.M.M., Foy, C.L. (Eds.), *Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions*. CRC .
- Gross, E., Erhard, E., & Yvanie, E. (2003). Allelopathic activities of *Ceratophyllum demersum* L. and *Najas marina* ssp. *Intermedia* (Wolfgang) Casper. *Hidrobiologia*, 506-509: 583-589.
- Hallegraeff, G. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia: March*, 79-99.
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista, L. P. (2010). *Metodología de la investigación* (5ta ed. ed.). México: Mc Graw Hill.
- Hilt, S., & Gross, E. M. (2008). Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes? *Basic and Applied Ecology*, 422-432.
- Hilt, S., Beutler, E., & Bauer, N. (2012). Comparison of methods to detect allelopathic effects of submerged macrophytes on green algae 1. *Journal of Phycology*, 40-44.
- Hutchinson, G. (1975). *A Treatise on Limnology*. New York: Wiley.
- Jang, M. H., Ha, K., & Takamura, N. (2007). Reciprocal allelopathic responses between toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*) and duckweed (*Lemna japonica*). *Toxicon*, 727-733.

- Jasser, I. (1995). The influence of macrophytes on a phytoplankton community in experimental conditions. *Hydrobiologia*, 21-32.
- Jeppesen, E. M., Sondegaard, & Jensen, J. (2003). Climatic warming and regime shifts in lake foods webs: some comments. *Limnology and Oceanography*, 1346-1349.
- Khalid, M. N., & Riaz, Z. (2015). Studies on bioactivity of *Chara braunii* CC Gmelin (Charophyta). . *Альгология*.
- Komárek, J., & Anagnostidis, K. (1999). *Cyanoprokaryota 1 Teil: Chroococcales*. H. Etts, G. Gärtner, H. Heynig and D. Mollenhauer (Eds.) Jena, Gustav Fischer.
- Körner, S., & Nicklisch, A. (2002). Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes1. *Journal of Phycology*, 862-871.
- Kufel, L., & Ozimek, T. (1994). Can *Chara* control phosphorus cycling in Lake Luknajno (Poland)? . *Hydrobiologia*, 277-283.
- Li, M., Zhu, W., Gao, L., & Lu, L. (2012). Changes in extracellular polysaccharide content and morphology of *Microcystis aeruginosa* at different specific growth rates. . *J. Appl. Phycol.*, 1023–1030.
- Lizarralde Oliver, S., & Ribeiro, H. (2014). Variabilidade climática e qualidade da água do Reservatório Guarapiranga. *Estudos avançados* 28, 82.
- López Pereira. (2014). *Informe de análisis final de monitoreo de vegetación acuática, calidad del agua, hidrometeorología e hidrometría de arroyos de Itapúa*. Entidad Binacional Yacyretá.
- López Pereira, V. (2013). *Fitoplancton del Arroyo Tacuary, Carmen del Paraná, Itapúa*.

- López Pereira, V. (2013). *Informe de análisis final de monitoreo de vegetación acuática, calidad del agua, hidrometeorología e hidrometría de arroyos de Itapúa. Entidad Binacional Yacyretá.*
- López Pereira, V. (2013). *Monitoreo de macrófitas acuáticas, calidad del agua, niveles hidrométricos de arroyos de Encarnación y Carmen del Paraná, Itapúa. Entidad Binacional Yacyretá (Informe final).*
- López Pereira, V. (2014). *Microalgas del fitoplancton del arroyo Tacuary, Ciudad de Carmen del Paraná, Departamento de Itapúa, Paraguay. Encarnación, Paraguay.*
- López Pereira, V. (2018). ISOLATION, CULTURE AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MICROCYSTIS SP TOXIC STRAIN FROM THE TACUARY RESERVOIR. *International Journal of Advanced Research. Int. J. of Adv. Res.* 6. doi:10.21474/IJAR
- Meerhoff, M., & Mazzeo, N. (2004). Importancia de las plantas flotantes libres de gran porte en la conservación y rehabilitación de lagos someros de Sudamérica. *R. revista Ecosistemas*, 13.
- Mendoza, R., Born-Schmidt, G., March, I., & Álvarez, P. (2014). Especies invasoras acuáticas y cambio climático, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.), *Especies acuáticas invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*, 469-495.
- Meurer, T., & Bueno, N. C. (2012). The genera Chara and Nitella (Chlorophyta, Characeae) in the subtropical Itaipu Reservoir, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 219-232.
- Monteiro, F. M. (2016). Presença de macrófitas submersas altera a dinâmica do fitoplâncton em reservatórios do semiárido?

- Mulderij G. a, b. W., Mooij, a. A., Smolders, c., & Van Donka, E. (2005). Allelopathic inhibition of phytoplankton by exudates from Stratiotesaloides. *Aquatic Botany*, 284–296.
- Mulderij, G., Van Donk, E., & Roelofs, J. G. (2003). Differential sensitivity of green algae to allelopathic substances from Chara. *Hydrobiologia*, 261-271.
- Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M., & Murakami, A. (1999). Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Water Science and Technology*, 47-53.
- Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M., & Murakami, A. (2000). Myriophyllum spicatum-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae Microcystis aeruginosa. *Water Research*, 3026-3032.
- Paerl, H., & Huisman, J. (2008). Blooms like it hot. *Science* , 57–58.
- Pakdel, F. M., Sim, L., Beardall, J., & Davis, J. (2013). Allelopathic inhibition of microalgae by the freshwater stonewort, Chara australis, and a submerged angiosperm, Potamogeton crispus. *Aquatic botany*, 110, 24-30.
- Peñuelas, J. (1987). Influencia de la presión, luz y temperatura sobre la producción de macrófitas en periodos cortos. Problemas metodológicos de la técnica del oxígeno. *Limnética*, 189-195.
- Polhemus, N. W. (2005). *How To: Perform an Optimization Experiment Using STATGRAPHICS Centurion*. StatPoint, Inc.
- Ramos Montaña, C., Cárdenas Avella, N., & Herrera Martínez, Y. (2012). Caracterización de la comunidad de Macrófitas acuáticas en lagunas del Páramo de La Rusia (Boyacá-Colombia). *Revista Ciencia en Desarrollo*, Vol. 4 No. 2 ISSN 0121-7488 , 73-82.
- Reynolds, C. (2006). *The Ecology of Phytoplankton (Ecology, Biodiversity and Conservation)*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Rodríguez, M. I., & et.al. (2005). Floraciones de algas en el embalse San Roque. . *XX Congreso Nacional del Agua y III simposio de Recursos Hídricos del Cono Sur. Mendoza, Argentina.*
- Sant'Anna, C. L. (2006). *Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. Interciência.* São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia.
- Saville, D. J. (1990). Multiple comparison procedures: the practical solution. *The American Statistician*, 174-180.
- Scheffer, M. (1998). Ecology of Shallow Lakes. *Chapman & Hall. London*, 357.
- Spence, D. (1982). The zonation of plants in freshwater lakes. . *Advances in Ecological Research*, 37-125.
- Tamayo y Tamayo, M. (2008). *El proceso de la investigación científica: Incluye evaluación y administración de proyectos de investigación (4ta. Ed.) ed.* México: Editorial Limusa.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología.* Ed. Médica Panamericana.
- Wetzel, R. (2001). Limnology. *Academic Press.*
- Wium-Andersen, S., Anthoni, U., Christophersen, C., & Houen, G. (1982). Allelopathic effects on phytoplankton by substances isolated from aquatic macrophytes (Charales). *Oikos*, 187-190.
- Zhang, S. H., Cheng, S. P., Wang, H. Q., He, F., & Wu, Z. B. (2009). Allelopathic interactions between the *Potamogeton* spp and toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*). *Allelopathy Journal*, 23.

ANEXO

Anexo 1

*Muestreo e identificación y cultivo de *Microcystis aeruginosa**



Ilustración 12 Muestreo de fitoplancton en el embalse Tacuary. Fecha: Enero-2018



Ilustración 13 Muestreo de fitoplancton en lago Ypacarai-Fecha: Febrero -2017



Ilustración 14 Muestreo de fitoplancton embalse Tacuary-Febrero-2017



Ilustración 15 Lectura de parámetros fisicoquímicos in situ en puntos de muestreo-Febrero-2018



Ilustración 16 Preparación de medio de cultivo BG11



Ilustración 17 Ajuste de pH del medio a 7,1



Ilustración 18 Preparación de medio de cultivo BG11



Ilustración 19 Ilustración 18-19. Preparación de medio de cultivo BG11



Ilustración 20 Esterilización de materiales para cultivo



Ilustración 21 Trabajo de observación y aislamiento de Microcystis aeruginosa



Ilustración 22 Observación e identificación para aislamiento



Ilustración 23 Observación e identificación para aislamiento



Ilustración 24 Cultivo en tubos para repique



Ilustración 25 Oxigenación manual

Anexo II

Resultado y prueba de fotobiorreactor

Ilustración 26 Prueba de fotobiorreactor

Ilustración 27 Prueba de fotobiorreactor

Ilustración 28 Prueba de fotobiorreactor

Ilustración 29 Prueba de fotobiorreactor



Anexo III

Muestreo e identificación de Chara Braunii Gmellin



Ilustración 30 . Muestreo de Chara Braunii Gmellin, embalse Tacuary, Punto 3



Ilustración 31 . Muestreo de Chara Braunii Gmellin, embalse Tacuary, Punto 3



Ilustración 32 Muestras de Chara Braunii Gmelin, embalse Tacuary. Punto 2



Ilustración 33 Muestras de Chara Braunii, embalse Tacuary. Punto 2



Ilustración 34 Muestreo e identificación del carófito



Ilustración 35 Muestreo e identificación del carófito

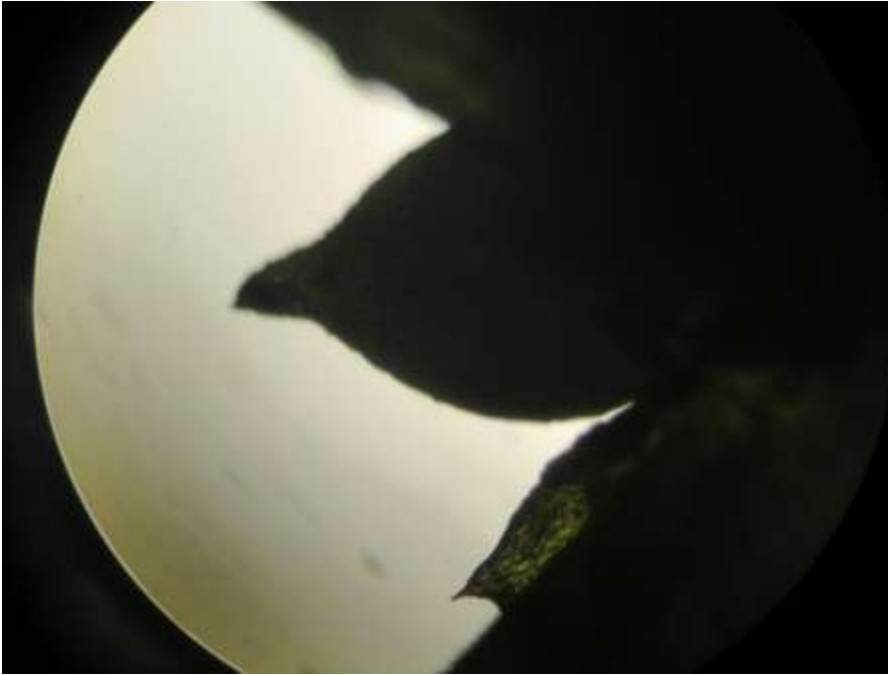


Ilustración 36 Brácteas y oogonio

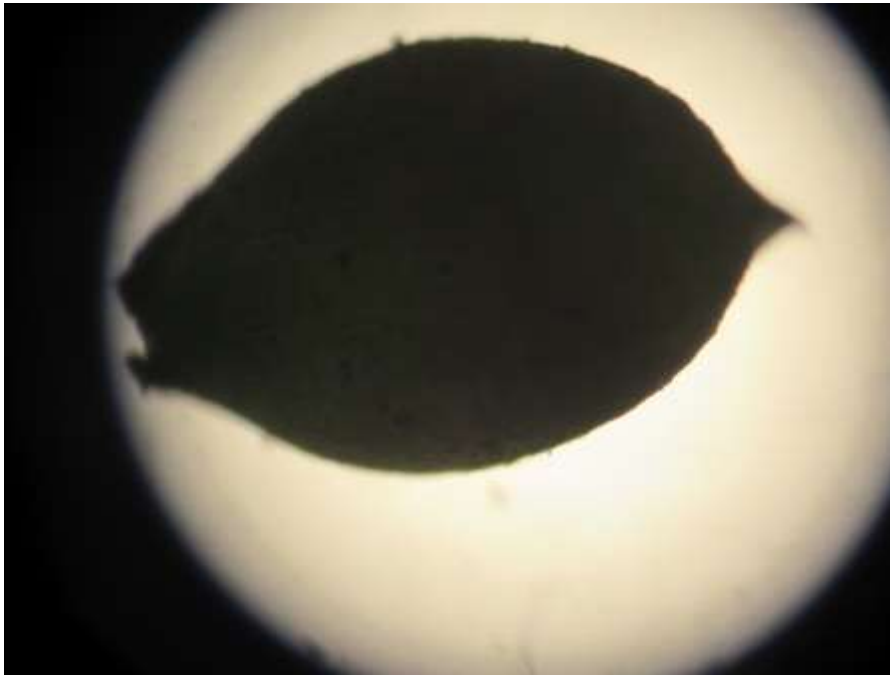


Ilustración 37 Oogonio (1,25 μ)

Anexo IV

Elaboración de extracto de Chara Braunii Gmelin



Ilustración 38 Lavado y pesaje de Chara Braunii Gmel para análisis



Ilustración 39 Lavado y pesaje de Chara Braunii Gmel para análisis



Ilustración 40 Lavado y preparación de Chara Braunii para extracción de esencia



Ilustración 41 Lavado y preparación de Chara Braunii para extracción de esencia



Ilustración 42 Elaboración del extracto de Chara Braunii Gmel



Ilustración 43 Elaboración del extracto de Chara Braunii Gmel

Anexo V***Prueba de inhibición y conteo de biovolumen por día***

Ilustración 44 Dosificación del extracto en cultivos de Microcystis aeruginosa



Ilustración 45 Dosificación del extracto en cultivos de Microcystis aeruginosa

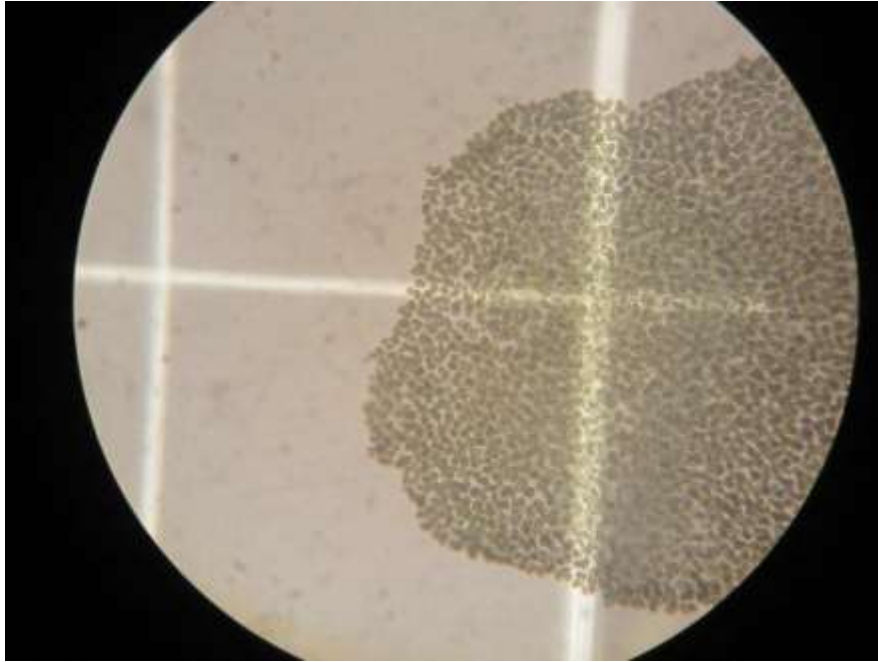


Ilustración 46 Recuento diario de concentración celular en cámara Neubauer

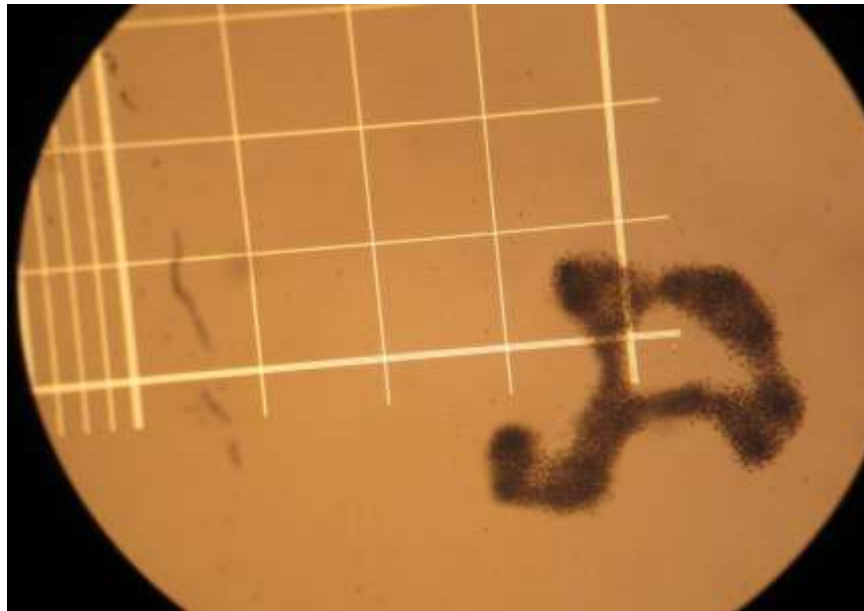


Ilustración 47 Recuento diario de concentración celular en cámara Neubauer



Ilustración 48 Cultivo de Microcystis aeruginosa con concentración del extracto de Chara Braunii



Ilustración 49 Cultivo de Microcystis aeruginosa con concentración del extracto de Chara Braunii



Ilustración 50 Cultivo de Microcystis aeruginosa con concentraciones del extracto de Chara Braunii



Ilustración 51 Cultivo de Microcystis aeruginosa con concentraciones del extracto de Chara Brauni

Anexo VI - Clave para el género Chara presente en el embalse Tacuary***Clave general.***

1. Plantas provistas de corticación (salvo Chara braunii, que es acortificada, y Ch. imperfecta, con corticación imperfecta; véase cada una de ellas); acículas más o menos desarrolladas.....1. Chara
- Plantas desprovistas de corticación; acículas ausentes.....2
2. Filoides no divididos, con brácteas de longitud variable en los nudos. Corónula del oogonióforo compuesta por 5 células dispuestas en una fila 3
- Filoides divididos, brácteas ausentes. Corónula del oogonióforo compuesta por 10 células dispuestas en 2 filas 4.

Clave general del género Chara.

1. Aparato vegetativo totalmente acortificado o con las células corticales disyuntas, separadas por un espacio vacío.....2
- Aparato vegetativo total o parcialmente cortificado.....3
2. Aparato vegetativo totalmente acortificado; estipuloides bien desarrollados, dispuestos en un solo verticilo, uno por filoide, agudos.....1 Ch. braunii

Fuente: Escribano *et.al.* 2008; Meurer *et.al.* 2008

Anexo VII - Descripción de *Chara braunii*1. *Chara braunii* C.C. Gmelin, Fl. Bad. 4 (Suppl): 646 (1826)

Planta monoica de 10-30(60) cm, erecta, ligeramente incrustada, en ocasiones con incrustaciones anulares, de color verde pardusco o verde claro casi transparente. Eje 0,5-1,5 mm de diámetro, entrenudos tan largos como los filoides. Corticación ausente. Acículas ausentes. Estipuloides 0,25-3,5 mm, inflados, agudos, dispuestos en un solo verticilo, alternando largos y cortos, uno por filoide. Filoides 8-10, a menudo curvados hacia el eje, con 3-5 segmentos, de los cuales los 1-2 superiores son más cortos, el último no más largo que las brácteas, agudo, formando en conjunto una corona terminal compuesta por 2-3 pequeñas células de ápice agudo. Brácteas 3-5, de tamaño variable, más pequeñas que el oogonióforo, a veces sólo están desarrolladas las anteriores. Bractéolas 2, similares a las brácteas anteriores, más cortas o de mayor longitud que el oogonióforo. Gametangios juntos en los 1-3 nudos inferiores de los filoides. Oogonióforos 510-850 x 370-530 um (sin incluir la corónula), solitarios o en grupos de 2(3); corónula 120-180 um de altura, con las células divergentes. Oospora 420-750 x 310-450 um, de marrón oscura a negra. Anteridióforo 225-415 um. n = 12,14. (Cirujano et al. 2008)



DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA

Yo, **María Victoria López Pereira**, con C.I N° 3.480.301, estudiante del Programa de Postgrado de Doctorado en Gestión Ambiental de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Itapúa, declaro que:

- El trabajo de tesis de Postgrado titulado: "Efecto inhibitorio de *Chara Braunii* Gmelin en el crecimiento poblacional de *Microcystis aeruginosa*", es de mi autoria y por tanto la originalidad y veracidad de los contenidos vertidos en ella son de mi exclusiva responsabilidad personal.
- He respetado las normas internacionales (APA, VANCOUVER, ISO) y cuidado el uso de las citas bibliográficas así como de las expresiones vertidas en el trabajo de tesis.
- El trabajo de tesis no ha sido publicado ni presentado anteriormente para obtener algún grado académico.
- Los datos presentados no atentan contra derechos de terceros, han sido de elaboración intelectual propia y no han sido copiados ni falsificados, por lo que

Manifiesto conocer las disposiciones legales nacionales y de la Universidad así como las sanciones aplicables, en caso de ser comprobado lo contrario a mi declaración, deslindando cualquier responsabilidad a la Universidad y a terceras personas por el daño ocasionado.

Nombre y Apellido: María Victoria López Pereira

Firma

Fecha 17/11/18