



Facultad de Ciencias
Universidad de la República

**Pasantía para obtener el título de Licenciada en Ciencias Biológicas, orientación
Ecología**

**Efectos de las plantas acuáticas *Potamogeton illinoensis* (Morong) y
Myriophyllum quitense (Kunth) sobre la clorofita *Ankistrodesmus* sp**

Andrea Lucía Garay Delbono

andrealgaray@gmail.com

Tutor: Néstor Mazzeo

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

2012

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Introducción	
2.1 Estados alternativos y rol de las plantas sumergidas.....	4
2.2 Alelopatía.....	5
2.3 Justificación.....	8
2.4 Hipótesis.....	9
2.5 Objetivo.....	9
3. Materiales y métodos	
3.1 Modelo de estudio	
3.1.1 Macrófitas.....	10
3.1.2 Fitoplancton.....	11
3.2 Diseño experimental empleado.....	12
3.3 Variables registradas.....	14
3.4 Modelo propuesto y análisis estadístico empleado.....	16
4. Resultados	
4.1 Condiciones de cultivo.....	19
4.2 Crecimiento exponencial de <i>Ankistrodesmus</i> sp.....	19
4.3 Cultivo de las macrófitas.....	20
4.4 Experimento 1	
4.4.1 Efecto de <i>P. illinoensis</i> sobre el crecimiento de <i>Ankistrodesmus</i> sp.....	20
4.5 Experimento 2	
4.5.1 Efecto de <i>P. illinoensis</i> sobre el crecimiento de <i>Ankistrodesmus</i> sp.....	22
4.5.2 Efecto de <i>M. quitense</i> sobre el crecimiento de <i>Ankistrodesmus</i> sp.....	27
4.5.3 Efecto comparativo de <i>P. illinoensis</i> y <i>M. quitense</i> sobre <i>Ankistrodesmus</i>	31
5. Discusión	33
6. Bibliografía	37
7. Anexo	43
8. Agradecimientos	46

1. RESUMEN

Las macrófitas sumergidas juegan roles ecosistémicos claves. La presencia de plantas disminuye la turbulencia del agua, aumenta la tasa de sedimentación en su entorno, brinda refugio al zooplancton que se alimenta de fitoplancton y reduce la concentración de nutrientes en la columna de agua, todos estos factores contribuyen directa o indirectamente a la inhibición del crecimiento del fitoplancton. Además las plantas acuáticas pueden liberar metabolitos secundarios que actúan como compuestos alelopáticamente activos sobre otros organismos fotosintetizadores competidores. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la presencia de las macrófitas *Potamogeton illinoensis* y *Myriophyllum quitense* genera cambios en el crecimiento de la clorofita *Ankistrodesmus* sp, mediante competencia por recursos (luz y nutrientes) o por efectos alelopáticos. Se realizaron experimentos de coexistencia en laboratorio para estudiar el efecto de las plantas sobre un cultivo de la clorofita *Ankistrodesmus* sp, contemplando los siguientes tratamientos: (1) Control (medio de cultivo y fitoplancton, sin macrófitas), (2) Control de nutrientes (medio de cultivo y macrófitas, sin fitoplancton), (3) Símiles plásticos de *P. illinoensis* o *M. quitense* (medio de cultivo, fitoplancton y símiles plásticos), y (4) Plantas reales de *P. illinoensis* o *M. quitense* (medio de cultivo, fitoplancton y macrófitas). En los ensayos realizados se encontró que las plantas acuáticas *P. illinoensis* y *M. quitense* presentaron un efecto negativo sobre el crecimiento de *Ankistrodesmus* sp, en ambos casos se observó el mismo patrón de crecimiento, el control alcanzó la mayor biomasa fitoplanctónica, luego le siguió el símil plástico y por último la planta real. En ambas especies la estructura de las plantas jugó un rol muy importante; sin embargo el efecto estructural (sombra y sedimentación) de *M. quitense* fue mayor que el de *P. illinoensis*. Se comprobó que las plantas no provocaron una reducción de nutrientes que afectara el crecimiento microalgal, observándose un crecimiento exponencial en todos los tratamientos. Sin embargo, se detectaron diferencias entre los tratamientos con plantas reales y los símiles plásticos lo que se podrían adjudicar a la presencia de compuestos alelopáticos, siendo el efecto de *M. quitense* dos veces mayor que el de *P. illinoensis* a lo largo del experimento.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Estados alternativos y rol de las plantas sumergidas

Las condiciones externas a los ecosistemas, como ser clima, reducción del agua subterránea, suministros de nutrientes o químicos tóxicos, fragmentación de hábitat, pérdida de biodiversidad, generalmente cambian gradualmente en el tiempo, y los ecosistemas pueden responder a los mismos de manera también gradual. Sin embargo, la teoría de los Estados Estables Alternativos plantea que los ecosistemas pueden cambiar abruptamente. Los regímenes de cambios se dan a causa de que el sistema reacciona sensiblemente a cambios de condiciones cuando se está cercano al umbral crítico. Una de las razones de esto podría ser la existencia de atractores alternativos en un determinado rango de condiciones (Scheffer *et al.*, 1993). Esta teoría ha sido postulada y discutida intensamente durante varias etapas de la historia de la ecología (Holling 1973; May 1977; Scheffer *et al.*, 2001; Beisner *et al.*, 2003; Scheffer & Carpenter, 2003; Folke *et al.*, 2004; Schroder *et al.*, 2005), el interés ha aumentado considerablemente desde que este fenómeno fue demostrado empíricamente en lagos someros templados. La hipótesis de esta teoría predice que en los lagos someros pueden ocurrir al menos dos estados alternativos: el estado de agua turbia que se debe a la elevada biomasa algal y/o resuspensión del sedimento y el estado con un predominio de vegetación acuática sumergida. Los cambios entre estos estados son generalmente abruptos y muy difíciles de revertir si no se modifican las condiciones externas (Scheffer *et al.*, 1993).

Las macrófitas sumergidas juegan diferentes roles ecosistémicos (Figura 1) y se considera que son de gran importancia para el mantenimiento del estado de agua clara en lagos someros (ej. Jeppesen *et al.*, 1997; Jeppesen *et al.*, 1998a). Las macrófitas sumergidas acumulan gran cantidad de nutrientes en su biomasa (ej. van Donk *et al.*, 1993; Kufel & Ozimek, 1994; Van Donk & Van de Bund, 2002), y junto a la asimilación por las microalgas epífitas, provocan una disminución de la disponibilidad de nutrientes en la columna de agua. Por esta razón muchas veces son grandes competidores de otros organismos autótrofos, como ser el fitoplancton. Al limitar el crecimiento del fitoplancton contribuyen a aumentar la transparencia del agua. Las macrófitas también incrementan la transparencia del agua al proveer refugio al

zooplancton (fitoplanctívoro) predado por peces planctívoros (Jeppesen *et al.*, 1998b; Burks *et al.*, 2002), y por la excreción de compuestos alelopáticamente activos que inhiben el crecimiento del fitoplancton (Gross, 2003; Scheffer *et al.*, 1993).

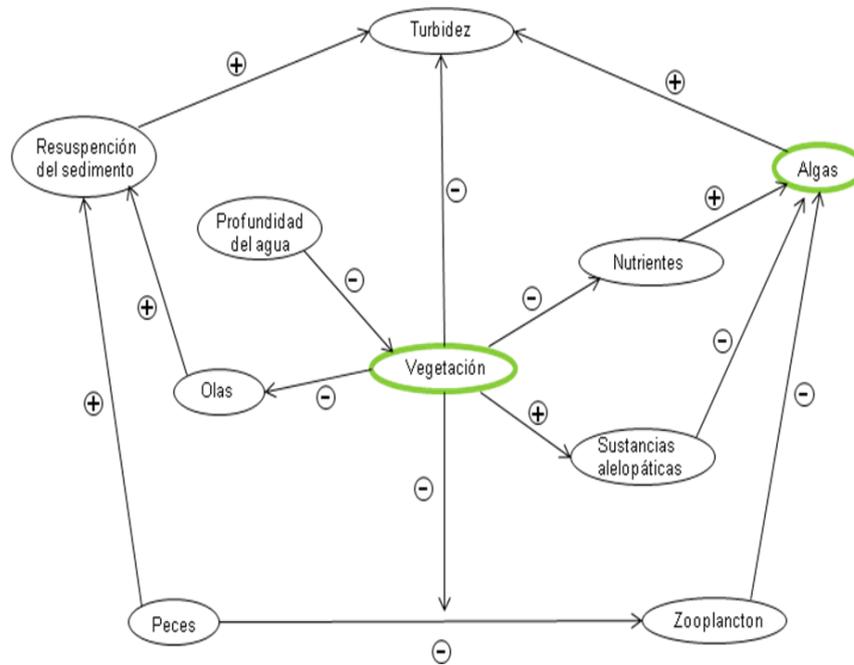


Figura 1. Interacciones entre la vegetación acuática y el resto de los componentes del sistema, con los signos de más y menos se indica si las interacciones son positivas o negativas respectivamente (Tomado de Scheffer *et al.*, 1993).

2.2 Alelopatía

La definición original de alelopatía hace referencia a interacciones bioquímicas estimuladoras o inhibitorias entre diferentes productores primarios o entre productores primarios y microorganismos (Molisch, 1937). Sin embargo la mayoría de los estudios recientes se han focalizado en los efectos inhibitorios de las sustancias alelopáticas (Gross, 2003). Existen varios casos de actividad alelopática en macrófitas, por ejemplo: *Chara* (Wium-Andersen *et al.*, 1982; Blindow & Hootsmans, 1991; Mulderij *et al.*, 2005), *Ceratophyllum* (Kogan & Chinnova, 1972; Wium-Andersen *et al.*, 1983; Wium-Andersen, 1987; Jasser, 1995; Mjelde & Faafeng, 1997; Nakai *et al.*, 1999; Körner & Nicklisch, 2002; Gross *et al.*, 2003), *Stratiotes aloides* (Mulderij *et al.*, 2005), *Myriophyllum* (Planas *et al.*, 1981; Jasser, 1995; Gross *et al.*, 1996; Nakai *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2000; Nakai *et al.*, 2001; Körner & Nicklisch, 2002; Leu *et al.*, 2002) y

Potamogeton (Jasser, 1995; Wu *et al.*, 2007), que resultan en cambios en la biomasa de fitoplancton, composición, y/o estructura del fitoplancton.

Las interacciones alelopáticas son un factor de gran debate debido a la dificultad de demostrar esta interacción *in situ* (Gross *et al.*, 2007). Aunque varios autores sugieren la existencia de esta interacción al observar diversos patrones de fitoplancton en estudios de lagos someros vegetados (Blindow, 1992; Mjelde & Faafeng, 1997), no existe suficiente evidencia acerca del rol de las interacciones alelopáticas a nivel ecosistémico (Hilt & Gross, 2008).

Willis (1985) plantea que se deben cumplir seis requisitos para demostrar la ocurrencia de alelopatía: (1) patrón de inhibición de determinados grupos de plantas o algas, (2) producción de compuestos alelopáticos por plantas, (3) liberación de esos compuestos, (4) su transporte y/o acumulación en el ambiente, (5) asimilación de los compuestos por organismos receptores o blancos y (6) la inhibición no puede ser explicada solamente por otros factores abióticos y bióticos, especialmente herbivoría y competencia. Muchas de las investigaciones en ecosistemas acuáticos no cubren estos seis requisitos, la evidencia para probar las interacciones alelopáticas todavía sigue siendo difícil (Gross, 2003). Se requiere de la combinación de experimentos *in situ* más realistas (Hilt & Gross, 2008). La actividad alelopática *in situ* se ve influenciada por otros factores, tales como, la sensibilidad diferencial ante aleloquímicos que existe dentro y entre los diferentes grupos taxonómicos de fitoplancton.

La revisión realizada por Gross y colaboradores en 2007 presenta diferentes aproximaciones metodológicas utilizadas para demostrar interacciones del tipo alelopáticas entre plantas acuáticas y algas (Figura 2). Las estrategias se pueden resumir de la siguiente forma:

- *Extractos de plantas u homogenizados.* Las macrófitas son homogenizadas con agua, incubadas por un cierto período de tiempo y filtradas. Posteriormente el filtrado es adicionado a organismos blanco. Esta metodología permite comparar el potencial alelopático de diferentes especies de macrófitas y variaciones estacionales de un modo sistemático. La aplicación de extractos en medios con y sin nutrientes limitantes permite evaluar las interacciones entre los tenores de nutrientes y la sensibilidad hacia los compuestos alelopáticos. Al mismo tiempo,

es posible evaluar el impacto de la disponibilidad de recursos en la producción de compuestos alelopáticos, mediante el cultivo de las plantas productoras bajo diferentes condiciones de luz y nutrientes. Sin embargo, estos experimentos presentan un bajo grado de realismo y no permiten una fácil identificación de los compuestos activos liberados. Existen ciertas dificultades para decidir el solvente a utilizar, muchos de los compuestos son lipofílicos, sin embargo el uso de solventes como etanol puede conducir a daños por toxicidad. La utilización del agua como solvente presenta ciertos inconvenientes, como ser la generación de problemas osmóticos.

- *Experimentos de coexistencia.* Se compara el crecimiento de plantas y/o algas cultivadas juntas y por separado. Estos experimentos brindan información acerca de interacciones negativas o positivas, pero en si mismos no proveen evidencia de que las interacciones alelopáticas ocurran, se deberán considerar factores de competencia por luz y nutrientes.
- *Experimentos con bolsas de diálisis.* Experimentos de coexistencia en los que los organismos son separados por membranas de diálisis, lo cual permite la libre circulación de moléculas de bajo peso molecular. En este tipo de experimentos se deberán considerar factores de competencia por luz y nutrientes. Se debe tener precaución acerca de las membranas de diálisis a utilizar ya que las mismas pueden liberar sustancias tóxicas y afectar los resultados; esto se soluciona utilizando membranas como las que se utilizan en la elaboración de frankfruters o salchichas para permitir el pasaje de las moléculas desde la planta hacia los organismos blanco. *Exudados de plantas.* Se compara el patrón de crecimiento de las especies blanco con y sin agregado de exudados, si se observan diferencias se le atribuye a interacciones alelopáticas. Los exudados se obtienen a partir de la filtración de macrófitas cultivadas o agua proveniente de sitios con alta densidad de macrófitas. Estos experimentos pueden fallar en la detección de alelopatías, ya sea por imperfecciones en el filtrado, o por la pérdida de efectos inhibitorios debido a la adsorción a superficies no blanco o la volatilidad de algunos compuestos. Lo anterior se puede solucionar mediante la adición secuencial de exudados durante el experimento.
- *Purificación de compuestos de extractos o exudados.* La extracción de compuestos activos provenientes del filtrado de cultivos se realiza con solventes

orgánicos o fases sólidas. Los compuestos activos son moderadamente lipofílicos, por lo tanto pueden ser extraídos por ejemplo con dietil o etil acetato.

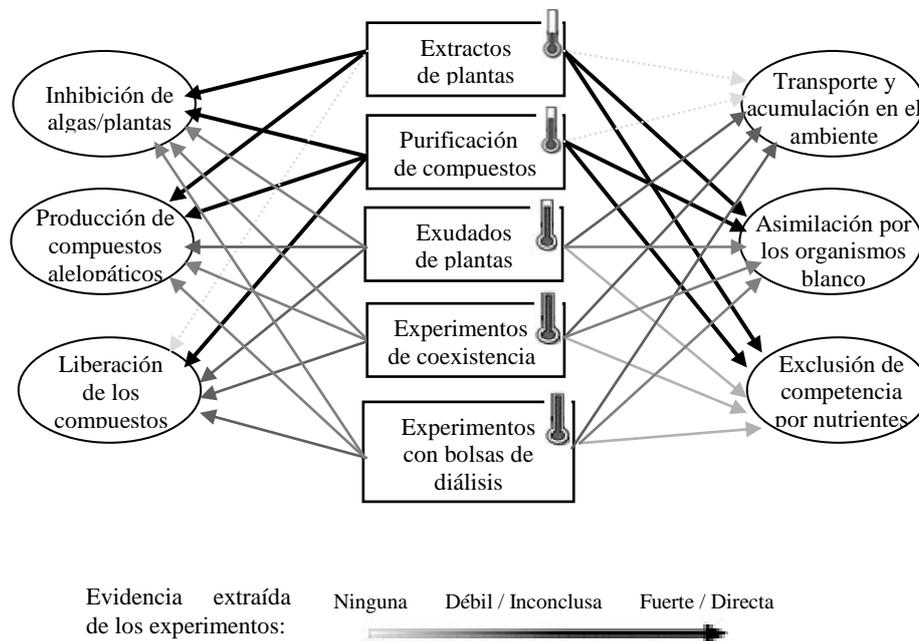


Figura 2. Representación esquemática la evidencia extraída de los diferentes experimentos (en cuadrados) utilizados para mostrar interacciones alelopáticas, para esto se hace referencia a los seis pre-requisitos establecidos por Willis (1985, elipses). El grado de realismo de las diferentes aproximaciones metodológicas se indica mediante los termómetros (Tomado de Gross *et al.*, 2003).

2.3 Justificación

Las macrófitas *Potamogeton illinoensis* y *Myriophyllum quitense* son plantas nativas muy frecuentes en los sistemas someros de Uruguay (Kruk *et al.*, 2009). Algunos sistemas someros con niveles de nutrientes correspondientes a la eutrofia e hipereutrofia, por ejemplo Laguna del Diario-Maldonado, se mantienen en fases de agua clara con una importante cobertura de ambas especies (De los Santos *et al.*, 2008). En este contexto, resulta relevante analizar la capacidad de *P. illinoensis* y *M. quitense* de controlar el crecimiento microalgal por limitación de nutrientes y/o por alelopatía. Es importante destacar que las especies estudiadas no cuentan con antecedentes científicos vinculados a los mecanismos que condicionan las interacciones fitoplancton-macrófitas.

2.4 Hipótesis

La hipótesis planteada en este trabajo es que la presencia de las macrófitas *P. illinoensis* y *M. quitense* condiciona una menor biomasa algal debido a la competencia por luz o nutrientes, y/o efectos alelopáticos que afecten su crecimiento. La hipótesis nula que se utilizará para el análisis estadístico será que no se observan cambios en la biomasa algal entre el tratamiento con plantas acuáticas y sus controles.

2.4 Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la presencia de las especies *P. illinoensis* y *M. quitense* genera cambios en el crecimiento de la clorofita *Ankistrodesmus* sp, mediante competencia por recursos (luz y nutrientes) y/o por efectos alelopáticos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Modelo de estudio

3.1.1 *Macrófitas*

La familia Potamogetonaceae está formada exclusivamente por macrófitas acuáticas perennes o raramente anuales, está constituida por los géneros *Potamogeton* y *Groenlandia* (Rodríguez & Irgang, 2001). El género *Potamogeton* está constituido por 69 especies (Wiegleb & Kaplan, 1998), es considerado uno de los más diversificados y con mayor importancia ecológica dentro de las macrófitas acuáticas (Haynes, 1985; Kadono, 1982). Es un género cosmopolita de hidrófitas vasculares, está conformado por plantas anuales o perennes que poseen una amplia distribución y habitan aguas lénticas o lóxicas, dulces o salobres. Son plantas sumergidas, arraigadas en el fondo con hojas sumergidas o sumergidas y flotantes. Se propagan por semillas y por órganos de reproducción asexual (tubérculos e hibernáculos). Desarrollan inflorescencias en espigas cilíndricas o capituliformes, compactas o laxas y pedunculadas (Tur, 1982). Presentan una gran variabilidad vegetativa lo cual hace dificultosa la clasificación taxonómica. Las especies de este género presentan gran plasticidad morfológica, como la mayoría de las macrófitas acuáticas debido a las diferencias en cuanto a las características físico-químicas del ambiente en donde viven (Sculthorpe, 1967; Tur, 1982). En Uruguay existen seis especies pertenecientes a esta familia (Alonso Paz, 1997). La especie *Potamogeton illinoensis* es una especie polimórfica, presenta tallos cilíndricos de hasta 4 mm de diámetro; hojas sumergidas y flotantes ausentes o presentes. Las hojas sumergidas son simples elípticas, obovadas a oblanceoladas de 13 a 35 mm de largo, relación ancho-largo 3-8.5, densamente reticuladas. Desarrolla espigas uniformes, cilíndricas con 16 a 36 flores (Rodríguez & Irgang, 2001).

La familia Haloragaceae está constituida por hierbas acuáticas y terrestres, con hojas alternas o verticiladas sin estípulas, con flores solitarias, en espigas o panículas, perfectas o imperfectas, actinomorfas. El fruto que producen puede ser drupa o esquizocarpo. El género *Myriophyllum* incluye a plantas perennes, sumergidas enraizadas. Presentan tallos sumergidos y ascendentes, radicantes en los nudos y glabros. Sus hojas son simples, opuestas, alternas o verticiladas. Las flores son solitarias

o en hacecillos axilares, de hasta 5 mm de largo, sésiles, imperfectas o perfectas, son plantas monoicas, raramente dioicas (Alonso Paz, 1997). En Uruguay existen tres géneros y cuatro especies de esta familia (Alonso Paz, 1997). *Myriophyllum quitense* es una especie nativa de Uruguay, presenta tallos de longitud variable, a veces semi-leñosos. Las hojas están dispuestas en verticilos, con 4 a 5 hojas en el mismo nivel y alcanzan una longitud de hasta 1,5 cm.

Las macrófitas utilizadas en este trabajo fueron colectadas en la Laguna del Diario (34°54'07``S – 55°00'27``O), sistema lacustre somero ubicado en el Departamento de Maldonado (Uruguay). Las plantas fueron lavadas con el fin de remover el zooplancton y macroinvertebrados asociados. Se cambiaron sucesivas veces de medio de cultivo previo a la experimentación para asegurar dicho cometido.

Las plantas se colocaron en frascos de vidrio de 100 ml con sedimento del mismo sistema, dentro de recipientes plásticos con siete litros de agua declorada y nutrientes, la relación de agua y nutrientes en la que se mantuvieron las plantas fue la misma a la utilizada durante los experimentos (Ver detalles en sección 3.3). Se utilizaron tallos o plantas con raíces cuando fue posible, estas se aleatorizaron en las unidades experimentales. El volumen de la columna de agua ocupado por las macrófitas fue del 30% por recipiente, esto es un PVI=30% (per cent volume infested en inglés).

3.1.2 Fitoplancton

El orden *Chlorococcales* agrupa a las denominadas algas verdes, estas son algas unicelulares o cenobiales provistas de una membrana bien definida. Este orden está constituido por 10 familias, entre ellas la familia *Oocystaceae* se caracteriza por multiplicarse por autoesporulación, no existe la división vegetativa ni la formación de zoosporas en su ciclo. El género *Ankistrodesmus* forma parte de dicha familia, se caracteriza por sus células fusiformes y largas. La multiplicación se realiza por la producción de 2,4 u 8 autosporas que presentan la misma forma que la célula madre (Bourrelly, 1966). Para este trabajo se utilizó un cultivo de *Ankistrodesmus* sp, el mismo se mantuvo en peceras con iluminación constante. Se utilizó el fertilizante comercial *Crece Más* como fuente de nutrientes, llegando a una concentración de 595 $\mu\text{g l}^{-1}$ de nitrato, 130 $\mu\text{g l}^{-1}$ de amonio y 259 $\mu\text{g l}^{-1}$ de fósforo reactivo soluble (medidos en

laboratio), a los cuales se observa un crecimiento exponencial del cultivo. Se realizaron ensayos previos a los experimentos para obtener la relación óptima de volumen de cultivo y nutrientes necesaria para observar un crecimiento exponencial del fitoplancton. En un crecimiento logístico la primer fase se corresponde a un crecimiento exponencial donde no existe limitación por recursos, pasado un tiempo los nutrientes limitan el crecimiento y se alcanza una meseta en el crecimiento cuya asíntota corresponde a la capacidad de carga.

3.2 Diseño experimental empleado

El efecto de las macrófitas *Potamogeton illinoensis* y *Myriophyllum quitense* sobre *Ankistrodesmus* sp se evaluó mediante experimentos de coexistencia en microcosmos. Se llevaron a cabo dos experimentos, en el primero se probó el efecto de *P. illinoensis*, y en el segundo se agregaron tratamientos para testear simultáneamente el efecto de *P. illinoensis* y de *M. quitense* a efectos de realizar comparaciones entre las especies.

Los tratamientos considerados en el experimento 1 fueron los siguientes :

- Control (medio de cultivo y fitoplancton, sin macrófitas)
- Control de nutrientes (medio de cultivo y *P. illinoensis*, sin fitoplancton)
- Símil plástico de *P. illinoensis* (medio de cultivo, fitoplancton y símil plástico)
- Planta real de *P. illinoensis* (medio de cultivo, fitoplancton y macrófita)

Para el experimento 2 (Figura 3) a los tratamientos considerados anteriormente se agregaron:

- Símil plástico de *M. quitense* (medio de cultivo, fitoplancton y símil plástico)
- Planta real de *M. quitense* (medio de cultivo, fitoplancton y macrófita)

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con tres repeticiones. Los tratamientos se asignaron al azar en los microcosmos sin restricciones en la aleatorización debido a que las unidades experimentales eran homogéneas.

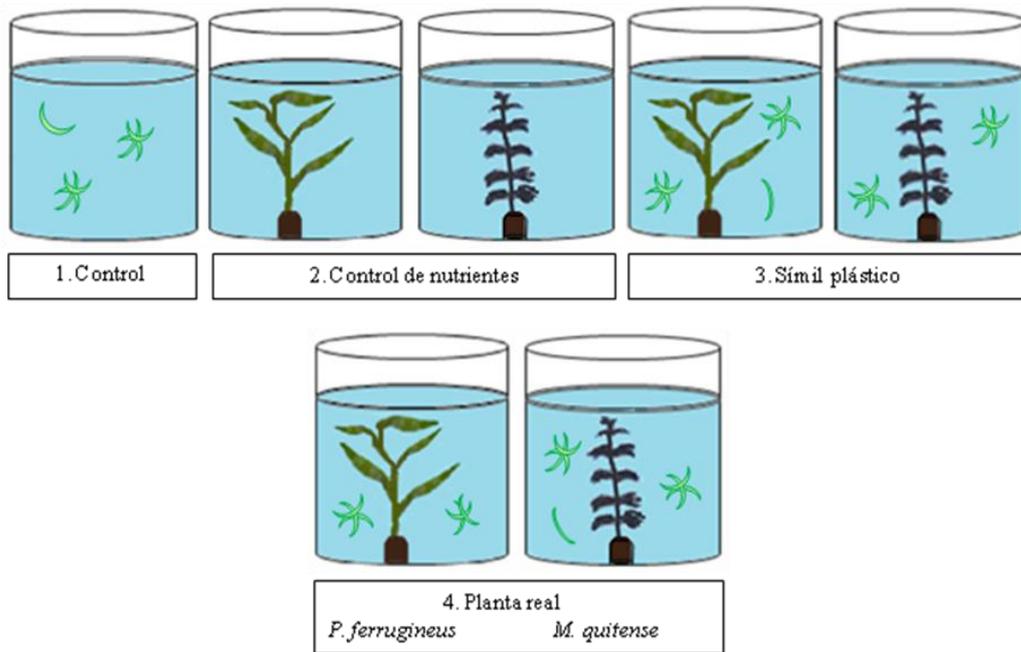


Figura 3. Esquema a modo ilustrativo de los tratamientos realizados en el experimento 2.

A efectos de poder discriminar los efectos de sombra, competencia por nutrientes y alelopatía se consideró un primer tratamiento denominado control a efectos de evaluar el crecimiento algal en ausencia de interacciones con las macrófitas. En este tratamiento se debe observar un crecimiento exponencial durante el período de tiempo considerado, indicación de no limitación del crecimiento por nutrientes. El tratamiento control de nutrientes se realizó para evaluar cuanto se reducen los nutrientes en el agua cuando las plantas están en ausencia de microalgas: si las plantas reducen significativamente los nutrientes disueltos pueden controlar el crecimiento del fitoplancton por la limitación por nutrientes. El fitoplancton puede verse afectado por la disminución de la luz o por el aumento de la sedimentación generado por la estructura de las plantas acuáticas. Precisamente, el tratamiento con símiles plásticos tiene como objetivo diferenciar el efecto estructural de las plantas (sombra y sedimentación, fundamentalmente) del efecto debido a la competencia por nutrientes o a la liberación de compuestos alelopáticos. Los microorganismos asociados a la superficie de las macrófitas reales (perifiton) fue cuidadosamente removido en los ejemplares cultivados en laboratorio. Dado que no es posible la remoción total y absoluta de perifiton, las macrófitas artificiales fueron incubadas junto con las macrófitas reales durante una semana previa a la experimentación a efectos de no introducir otras fuentes de variación al análisis. En el caso de *M. quitense* se utilizó una planta de acuarismo del mismo

género que presentaba la misma estructura que la planta real. Para *P. illinoensis* se utilizaron hojas de una planta plástica similar, con la misma estructura y tamaño de hojas, y las mismas se agregaron a tubos plásticos finos a modo de tallo y se fijaron en los mismos frascos con sedimento que las plantas reales.

La experimentación tuvo una duración de 7 días en condiciones controladas, a una temperatura ambiente de 20 °C y un fotoperíodo de 14:10 hrs (luz:oscuridad), a una intensidad de luz de 120 $\mu\text{mol PAR}$. Se utilizaron oxigenadores y se hizo circular el agua manualmente cada día previo a las mediciones, con el fin de contrarrestar la sedimentación algal y lograr la homogenización del medio.

Los microcosmos utilizados consistieron en recipientes plásticos con un volumen de 10 L, y fueron llenados con siete litros de agua. Para la realización de los experimentos se utilizó agua de clorada; para permitir la volatilización del cloro se dejó reposar el agua 48 hs previo a su utilización. Como medio de cultivo se utilizó agua de clorada con fertilizante líquido comercial *Crece Más* que contiene macro y micro nutrientes. Con dicho medio se mantuvieron las plantas luego de ser colectadas, el cultivo de *Ankistrodesmus* sp, y con el mismo medio se realizaron los experimentos. A cada microcosmo se le agregó 3 ml de *Crece Más*, y a los tratamientos que correspondía 150 ml de cultivo de *Ankistrodesmus* sp, con una concentración de 800 $\mu\text{g l}^{-1}$ de clorofila *a*. Las características iniciales del medio de cultivo fueron: 1742 $\mu\text{g l}^{-1}$ de nitrógeno total, 595 $\mu\text{g l}^{-1}$ de nitrato, 130 $\mu\text{g l}^{-1}$ de amonio, 258 $\mu\text{g l}^{-1}$ de fósforo total y 259 de fósforo reactivo soluble.

3.3 Variables registradas

La biomasa total *in situ* del fitoplancton fue medida como clorofila *a* (Clo *a*) en unidades fluorométricas. La clorofila y la turbidez del medio se determinaron diariamente mediante un fluorómetro-turbidímetro (Aquafluor, Turner Designs). Para este análisis se tomaron muestras integradas mediante pipetas evitando la remoción de perifiton adherido a las plantas. A efectos de obtener una estimación de la biomasa de *Ankistrodesmus* en microgramos por litro a partir de las lecturas del fluorómetro, se realizó una curva de calibración con la clorofila *a* extraída con etanol caliente (Nusch,

1980; Figura 4). Una unidad fluorométrica de clorofila *a* se corresponde con $9.837 \mu\text{g l}^{-1}$ de este pigmento.

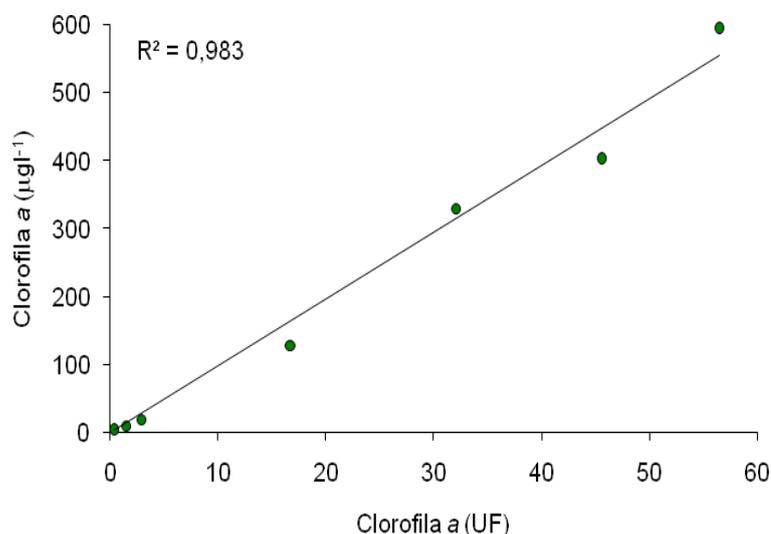


Figura 4. Regresión lineal ajustada entre la clorofila *a* extraída por el método de etanol caliente y las mediciones fluorométricas de clorofila *a* realizadas en siete diluciones del cultivo de *Ankistrodesmus* sp. La recta ajustada es: $y = 9.837x$.

Se estimó la tasa de crecimiento del fitoplancton como el aumento en la concentración de clorofila por unidad de tiempo. Dicha tasa se calculó en cada tratamiento como la pendiente de la recta ajustada (regresión lineal) entre el logaritmo neperiano del contenido de clorofila *a* en función del tiempo.

Se realizaron mediciones del rendimiento cuántico (del inglés quantum yield) del fitoplancton cada dos días a través de pulsos de amplitud modulados (fluorómetro Walz, Alemania). El rendimiento cuántico hace referencia a la probabilidad de que la energía absorbida de un fotón sea utilizada para la fotosíntesis (entre a la cadena de transporte de electrones, etc), por lo que esta medida es utilizada como un indicador de la eficiencia fotosintética (Maxwell & Johnson, 2000).

Con el fin de determinar las características físicas-químicas del agua se tomaron medidas *in situ* cada dos días. Se determinó temperatura, concentración de oxígeno disuelto en ppm y porcentaje de saturación con un oxímetro (OxyGuard, Handy Gamma); pH con el sensor DIGITAL pH METER y conductividad (Hanha).

Se colectaron muestras al inicio y al final del experimento para analizar la concentración de nutrientes totales y disueltos. Se colectaron 60 ml de agua de cada mesocosmo para el análisis de nutrientes totales y otros 60 ml fueron filtrados a través de un filtro GF/C (Whatmann) para los análisis de nutrientes disueltos. Se determinó la concentración de nitrato (Müller & Widemann, 1955), amonio (Koroleff, 1970) y fósforo reactivo soluble (Murphy & Riley, 1962). Para la determinación de nitrógeno y fósforo total, se oxidaron todos los compuestos nitrogenados en medio básico y los fosforados en medio ácido (Valderrama, 1981). El nitrógeno total se midió como nitrato mediante el procedimiento de Müller & Widemann (1955) y el fósforo total como fósforo reactivo soluble utilizando el procedimiento de Murphy & Riley (1962).

Finalmente se cuantificó el peso fresco y seco final de las plantas reales utilizadas en cada microcosmo con el fin de evaluar si existieron diferencias significativas entre los tratamientos vegetados.

3.4 Modelo propuesto y análisis estadístico empleado

Para las variables registradas sucesivas veces sobre las unidades experimentales (clorofila *a*, turbidez, rendimiento cuántico, temperatura, concentración de oxígeno, pH y conductividad) se procedió al análisis de las medidas repetidas con modelos mixtos. Los modelos mixtos afrontan de forma directa el problema relativo a la modelación de la estructura de covarianza de los efectos aleatorios (Ver Anexo). Es posible evaluar el ajuste de modelos con diferentes estructuras, y hacer inferencias a partir del modelo que mejor se ajuste a los datos. Como fuentes de variación se incluyeron: el factor tratamiento, el tiempo, la interacción tratamiento por tiempo y los errores asociados. Las hipótesis a probar en un análisis de medidas repetidas en el tiempo con el factor tratamiento agrupando las observaciones son: 1) no hay interacción tiempo por tratamiento, 2) no hay efecto tiempo y 3) no hay efecto tratamiento. El modelo propuesto es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \gamma_i + t_k + (T \times t)_{ik} + \epsilon_{ijk}$$

donde,

Y_{ijk} : Contenido de clorofila del i -ésimo tratamiento, j -ésima repetición y k -ésimo tiempo.

μ : Media poblacional.

T_i : Efecto del tratamiento i , $i = 1, 2, 3, 4$.

γ_i : Error asociado al tratamiento i , efecto aleatorio de la unidad experimental.

t_k : Efecto del tiempo k , $k = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$.

$(T \times t)_{ik}$: Efecto de la interacción del tratamiento i y el tiempo k .

ε_{ijk} : Error experimental

Se evaluaron diferentes formas de modelar la correlación en el tiempo mediante el uso de modelos mixtos. Se probaron seis estructuras de la matriz de varianzas y covarianzas: simetría compuesta, autorregresivo de orden 1, autorregresivo de orden 1 con efecto aleatorio, autorregresivo de orden 1 con varianzas heterogéneas, antedependencia, Toeplitz y la matriz sin restricciones (*unstructured*) (Littell *et al.*, 2000). Con el fin de seleccionar el modelo con la matriz de varianzas y covarianzas que mejor se ajuste a los datos se utilizó el criterio de información Akaike (AIC).

Con el objetivo de que se cumpla el supuesto de homoscedasticidad en el análisis de medidas repetidas de la variable clorofila a se transformaron los valores aplicando el logaritmo neperiano. Este análisis se realizó para el experimento 1 de *P. illinoensis* y de forma global para las observaciones del experimento 2 de *P. illinoensis* y *M. quitense*, en los resultados se muestran de manera separada para simplificar la presentación. Para la comparación de los efectos de los tratamientos se utilizaron contrastes ortogonales.

Para el análisis de la tasa de crecimiento, el peso de las plantas y la comparación de los nutrientes entre tratamientos se procedió con un análisis de varianza de una vía en los que se verificaron los supuestos de homogeneidad de varianzas y distribución normal de los residuos. Se utilizó una aproximación visual a los supuestos con los gráficos de residuos versus predichos, histogramas de los residuos y qq-plot (cuantiles observados versus cuantiles teóricos de una distribución normal), y se realizaron las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk.

Se trabajó con los programas estadísticos SAS (con el procedimiento mixed) y R (con la librería nlme).

4. RESULTADOS

4.1 Condiciones de cultivo

Con respecto a las condiciones de cultivo, los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura promedio de la columna de agua de 19 °C y no presentó variaciones significativas a lo largo del tiempo. La conductividad y el pH presentaron una media de 233 $\mu\text{Si cm}^{-1}$ y 8 respectivamente, y no variaron de manera significativa durante los experimentos ni entre tratamientos. El porcentaje de saturación del oxígeno fue del 94%, no se observaron diferencias en el tiempo ni entre los tratamientos en ambos experimentos. El nitrógeno y fósforo total inicial promedio fue de 1742 y 258 $\mu\text{g l}^{-1}$ respectivamente. El nitrógeno disuelto inicial en forma de nitrato fue de 595 $\mu\text{g l}^{-1}$ y el amonio 130 $\mu\text{g l}^{-1}$. El fósforo reactivo soluble inicial fue de 259 μgl^{-1} . No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de nutrientes iniciales entre tratamientos.

4.2 Cultivo de las macrófitas

Las dos especies seleccionadas se adaptaron a las condiciones de cultivo y se desarrollaron favorablemente en laboratorio. No se encontraron diferencias significativas con respecto al peso fresco ($F_{(3, 3)}= 0.87$, $p=0.498$) y seco ($F_{(3, 3)}= 3.71$, $p=0.061$) calculado al final del experimento entre los tratamientos con plantas reales (Tabla 1).

Tabla 1. Peso fresco y seco de las plantas al final del experimento.

	Peso fresco (g)		Peso seco (g)	
	Media	Rango	Media	Rango
<i>M. quitense</i>	19.15	16.24 - 23.32	1.46	1.23 - 1.80
<i>P. illinoensis</i>	21.18	17.82 - 24.16	1.87	1.6 - 2.23

4.3 Crecimiento exponencial de *Ankistrodesmus* sp

El crecimiento de *Ankistrodesmus* sp en el medio de cultivo seleccionado, bajo las condiciones de laboratorio antes descritas, fue exponencial (Figura 5). Se logró un crecimiento de la microalga que no estuvo limitado por nutrientes en ninguno de los experimentos.

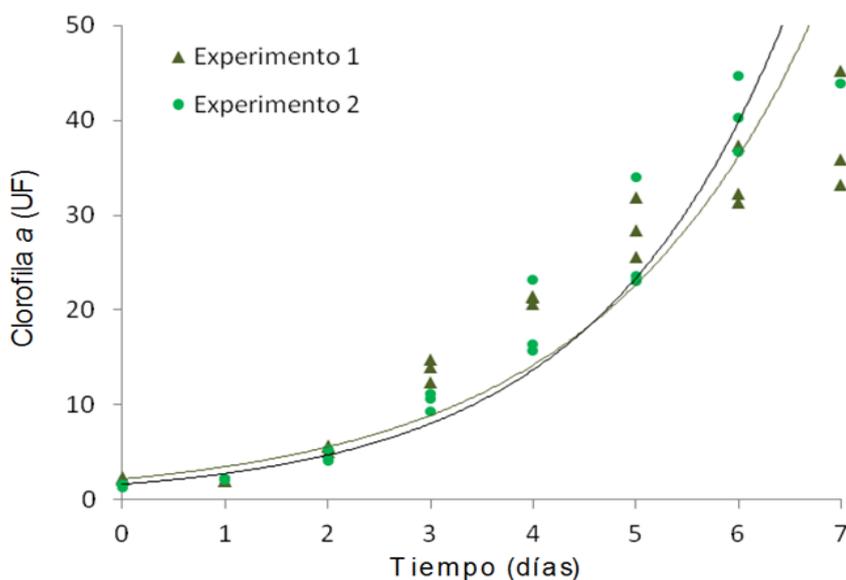


Figura 5. Crecimiento exponencial de los controles en el experimento 1 y 2.

4.4 Experimento 1

4.4.1 Efecto de *P. illinoensis* sobre el crecimiento de *Ankistrodesmus* sp

La Clo *a* presentó un rango de variación de 20 a 445 $\mu\text{g l}^{-1}$. Los tratamientos comenzaron con un valor promedio de Clo *a* de 21.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ y un desvío estándar de 1.1 $\mu\text{g l}^{-1}$, no existieron diferencias significativas en el contenido de clorofila *in situ* al comienzo del experimento ($F_{(2,6)}=0.82$, $p=0.4834$). El tratamiento con la planta real de *P. illinoensis* fue el que presentó el menor crecimiento algal, luego le siguió el tratamiento con el símil plástico de *P. illinoensis* y el control (Figura 6). Al final del experimento la biomasa algal del tratamiento con el símil plástico fue un 25% menor que en el control, y en presencia de la planta real la concentración de clorofila final fue un 37% menor que el control (Tabla 2). En el análisis de medidas repetidas realizado, el modelo mixto que mejor se ajustó a los datos fue el que presentó una estructura de la matriz de varianzas-covarianzas autorregresiva de orden 1. A partir del modelo ajustado

se obtiene que el factor tratamiento, tiempo y la interacción tiempo por tratamiento fueron significativos ($F_{(2,11.9)}=25.65$, $p<0.0001$; $F_{(7,38.3)}=701.09$, $p<0.0001$; $F_{(14,37.4)}=7.60$, $p<0.0001$ respectivamente). Con respecto al control y al tratamiento con el símil plástico de *P. illinoensis* en los contrastes realizados se observaron diferencias significativas desde el día 3 hasta el día 7 del experimento. En el control con la planta plástica la clorofila *a* fue estadísticamente mayor que con la planta real a partir del día 3. En el día uno y dos no se observan diferencias significativas.

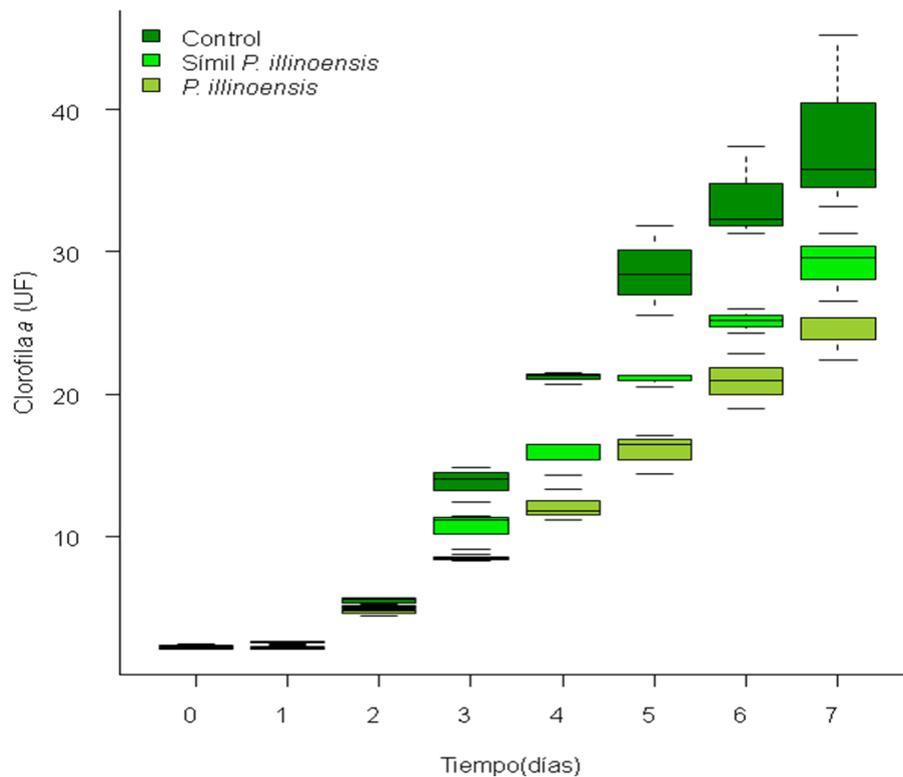


Figura 6. Boxplot del contenido de clorofila *a* en unidades de fluorescencia en el tratamiento de *P. illinoensis* y sus controles en función del tiempo en el experimento 1. La base y el alto de las cajas representan el primer y tercer cuartil respectivamente, las barras verticales son ± 1.5 veces el rango intercuartilico y la línea horizontal dentro de las cajas indica la mediana.

Tabla 2. Clorofila promedio de los tratamientos en el experimento 1 de *P. illinoensis* y su error estándar, y el porcentaje de reducción de la biomasa promedio con respecto al control. Con letras se muestra los resultados de la prueba de comparación de Tukey (nivel de significancia $p=0.05$).

Tratamiento	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g l}^{-1}$)		Reducción respecto al control (%)
	Inicial	Final	
Control	22.1 \pm 1.6	374.7 \pm 62.1	-
Símil <i>P. illinoensis</i>	20.9 \pm 0.9	284.3 \pm 27.3	24.0 A
<i>P. illinoensis</i>	21.5 \pm 0.5	239.7 \pm 17.0	29.8 A

En todos los tratamientos el crecimiento de *Ankistrodesmus* sp fue exponencial. Se obtuvieron valores del coeficiente de determinación (R^2) cercanos a uno en el ajuste lineal del logaritmo del contenido de clorofila *a in situ* en función del tiempo (Figura 7). Con respecto a la tasa de crecimiento de la microalga, existieron diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(2,6)}=6.69$, $p=0.0297$; Figura 7). La tasa de crecimiento en presencia de *P. illinoensis* ($0.399 \mu\text{g l}^{-1}\text{día}^{-1}$) disminuyó significativamente respecto al control ($0.468 \mu\text{g l}^{-1}\text{día}^{-1}$). Por otro lado, la tasa en el tratamiento con el símil ($0.418 \mu\text{g l}^{-1}\text{día}^{-1}$) se encuentra en una situación intermedia y no se diferenció de los anteriores.

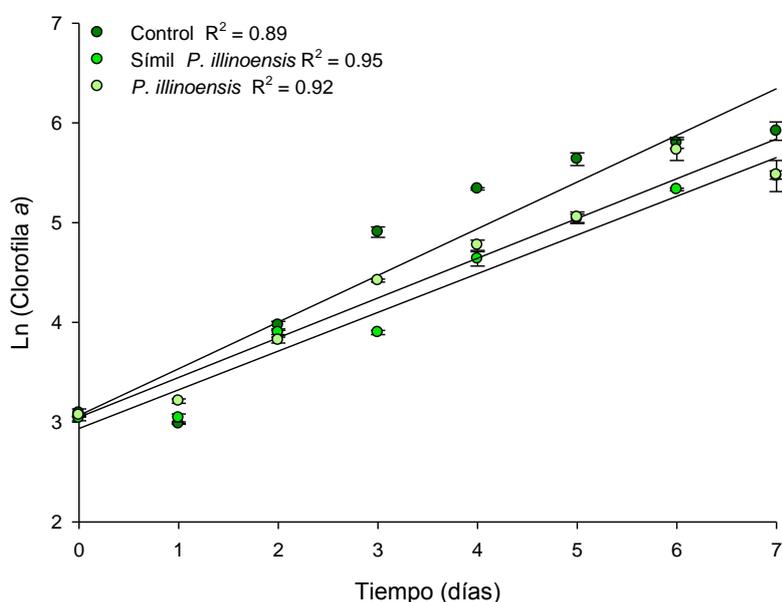


Figura 7. Logaritmo natural del contenido de clorofila *a in situ* en función del tiempo para cada tratamiento en el experimento 1. Se muestra el coeficiente de determinación (R^2) de la regresión lineal realizada para cada tratamiento. Los puntos representan las medias del logaritmo de clorofila *a* en cada tiempo y las barras verticales el desvío estándar correspondiente.

4.5 Experimento 2

4.5.1 Efecto de *P. illinoensis* sobre el crecimiento de *Ankistrodesmus* sp

La Clo *a* presentó un rango de variación de 13.0 a 521.4 $\mu\text{g l}^{-1}$, los tratamientos comenzaron con un valor promedio de Clo *a* de 15.3 $\mu\text{g l}^{-1}$, y un desvío de 1.0 $\mu\text{g l}^{-1}$. El tratamiento con la planta real de *P. illinoensis* fue el que presentó el menor crecimiento

algal, luego le siguió el tratamiento con la planta plástica y el control (Figura 8). Al final del experimento la biomasa algal del tratamiento con el símil plástico fue un 45% menor que en el control, y en presencia de la planta real la biomasa final fue un 52% menor que el control (Tabla 3). El modelo que mejor se ajustó a los datos en el análisis de varianza de medidas repetidas fue el que presentó una matriz de varianza-covarianza del tipo antedependencia. A partir del modelo ajustado se obtuvo que el factor tratamiento, tiempo y la interacción tiempo por tratamiento fueron significativos ($F_{(4,10)}=27.4$, $p<0.0001$; $F_{(7,14)}=101.3$, $p<0.0001$; $F_{(28,19)}=5.6$, $p=0.0001$ respectivamente). De los contrastes ortogonales realizados para estimar las diferencias entre tratamientos en el modelo mixto ajustado, se obtuvo que a partir del primer día se encontraron diferencias significativas entre el control y el símil plástico de *P. illinoensis*. Sin embargo, no se observaron diferencias en el contenido de clorofila *in situ* de tratamiento con símil plástico y la planta real a lo largo del experimento.

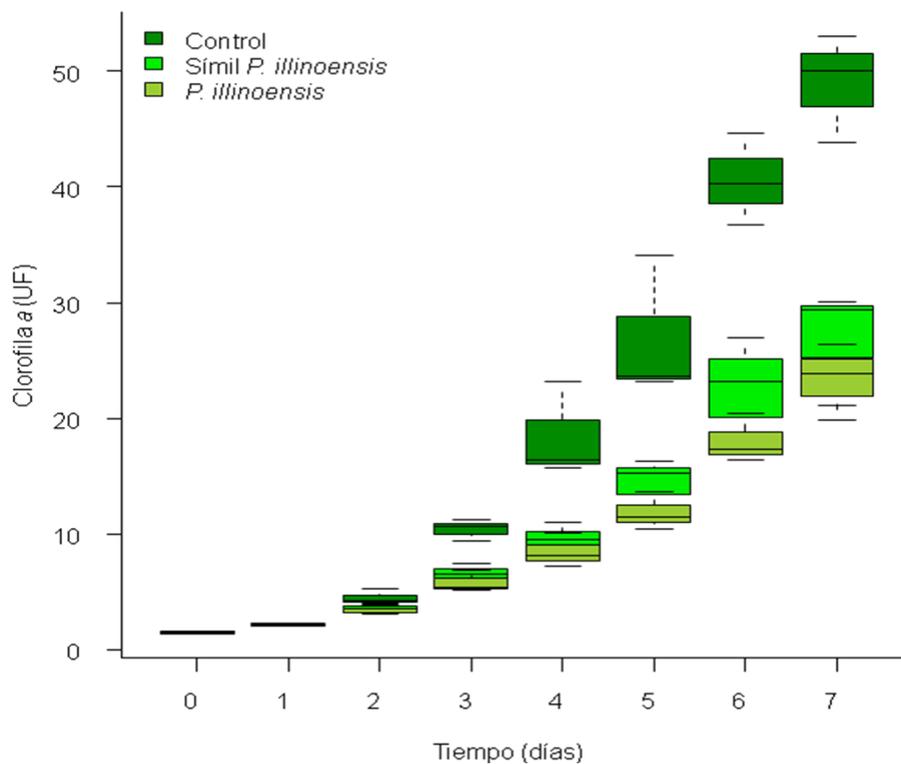


Figura 8. Boxplot del contenido de clorofila *a* en unidades de fluorescencia en el tratamiento de *P. illinoensis* y sus controles en función del tiempo en el experimento 2. La base y el alto de las cajas representan el primer y tercer cuartil respectivamente, las barras verticales son ± 1.5 veces el rango intercuartilico y la línea horizontal dentro de las cajas indica la mediana.

Tabla 3. Clorofila promedio de los tratamientos en el experimento 2 de *P. illinoensis* y su error estándar, y el porcentaje de reducción de la biomasa promedio con respecto al control. Con letras se muestra los resultados de la prueba de comparación de Tukey (nivel de significancia $p=0.05$).

Tratamiento	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g l}^{-1}$)		Reducción respecto al control (%)
	Inicial	Final	
Control	14.7 ± 1.7	481.7 ± 46.0	-
Símil <i>P. illinoensis</i>	15.9 ± 0.3	264.0 ± 48.4	43.3 A
<i>P. illinoensis</i>	15.3 ± 0.6	229.7 ± 32.4	51.4 A

Todos los tratamientos presentaron un crecimiento exponencial de la biomasa algal. Se obtuvieron coeficientes de determinación cercanos a uno en las regresiones lineales ajustadas en cada tratamiento (Figura 8). La tasa de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp se vio reducida cuando estuvo presente *P. illinoensis* o el símil plástico ($F_{(2,6)}=23.55$, $p=0.0014$). La tasa de crecimiento en el control fue $0.52 \mu\text{g Clo } a \text{ l}^{-1}\text{día}^{-1}$, mientras que la tasa en el tratamiento con la planta real y con el símil fue 0.40 y 0.42 respectivamente.

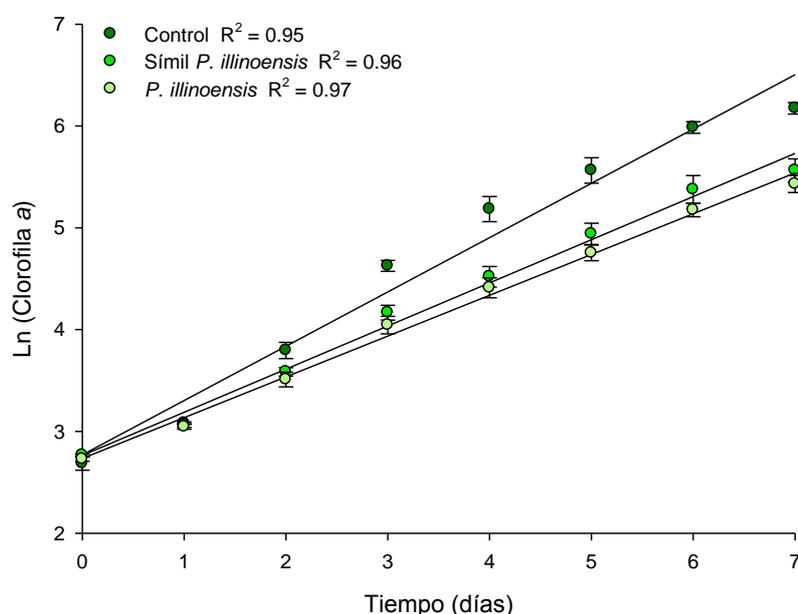


Figura 8. Logaritmo natural del contenido de clorofila *a in situ* (UF) en función del tiempo para cada tratamiento en el experimento 1. Para cada regresión lineal se muestra el coeficiente de determinación (R^2) correspondiente. Los puntos representan las medias del logaritmo de clorofila *a* en cada tiempo y las barras verticales el desvío estándar.

La eficiencia fotosintética del cultivo evaluada a partir de PAM no presentó diferencias significativas a lo largo del tiempo entre los tratamientos, presentó una eficiencia fotosintética con media y desvío de 0.698 ± 0.015 .

La concentración promedio final de nitrógeno y fósforo total en el control fue de 1176 y 192 $\mu\text{g l}^{-1}$ respectivamente. Las concentraciones finales de los nutrientes disueltos evaluados fueron de 9 $\mu\text{g l}^{-1}$ de fósforo reactivo soluble, 23 $\mu\text{g l}^{-1}$ de nitrato y 19 $\mu\text{g l}^{-1}$ de amonio, lo cual representa una reducción con respecto a las concentraciones iniciales del 97, 96 y 91 % respectivamente.

Al último día del experimento el fósforo reactivo soluble se redujo en promedio un 68%, existiendo diferencias significativas en la reducción de este nutriente entre los tratamientos ($F_{(3,8)}=23.47$, $p=0.0003$; Figura 10a). A partir del test de Tukey se formaron dos grupos, el primero con una media menor (67% de reducción) conformado por los tratamientos con plantas reales y el segundo que alcanzó un 94% de reducción constituido por el control y el tratamiento con el símil plástico. El nitrato disuelto al final del experimento se redujo en promedio un 87% con respecto al primer día, la reducción fue estadísticamente diferente entre los tratamientos ($F_{(3,8)}=129.4$, $p<0.0001$; Figura 10b). La reducción de la concentración de amonio (Figura 10c) fue del 91%, y no se registraron diferencias entre los tratamientos.

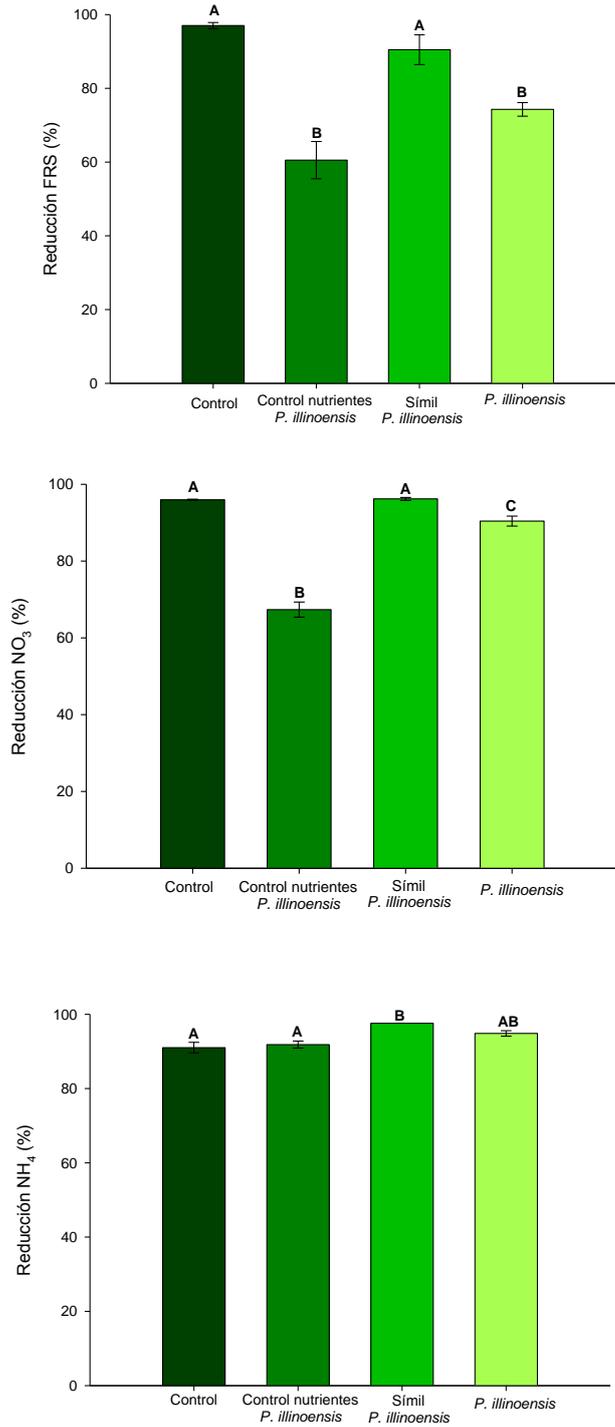


Figura 10. Reducción de la concentración de fósforo reactivo soluble (a), nitrato (b) y amonio (c), con respecto a la concentración inicial en cada tratamiento. Con letras se muestran los resultados de la prueba de comparación de Tukey (nivel de significancia 0.05). Se indican las medias de reducción con su desvío estándar.

Si se toma como referencia la asimilación de nutrientes que realiza el fitoplancton en el tratamiento control, la biomasa que está presente en el tratamiento con el símil plástico debería reducir un 53% del fósforo reactivo soluble, sin embargo reduce el 90.5% de dicho nutriente. En el tratamiento con *P. illinoensis* se da una reducción del 74% mientras que dada su biomasa debería reducir el 46% del fósforo reactivo soluble.

Con respecto al nitrato disuelto sucede algo similar, dada la biomasa presente en el tratamiento con símil y con la planta real se debería reducir un 53 y 46%, sin embargo se reduce un 96 y 90% respectivamente.

4.5.2 Efecto de *M. quitense* sobre el crecimiento de *Ankistrodesmus sp*

La Clo *a* presentó un rango de variación de 13.0 a 521.4 $\mu\text{g l}^{-1}$. Los tratamientos comenzaron con un valor promedio de Clo *a* de $15.7 \pm 1.5 \mu\text{g l}^{-1}$ y no existieron diferencias significativas en el contenido de clorofila al inicio. El tratamiento con *M. quitense* fue el que presentó el menor crecimiento algal, luego le siguió el tratamiento con la planta plástica y el control (Figura 11). Al final del experimento la biomasa algal del tratamiento con el símil plástico fue un 58% menor que en el control, y en presencia de la planta real la biomasa final fue un 74% menor que el control (Tabla 3). Como se mencionó en la sección anterior el modelo que mejor se ajustó a los datos en el análisis de varianza de medidas repetidas fue el que presenta una matriz de varianza covarianza del tipo antedependencia. Los factores tratamiento, tiempo y la interacción tiempo por tratamiento fueron significativos ($F_{(4,10)}=27.4$, $p<0.0001$; $F_{(7,14)}=101.3$, $p<0.0001$; $F_{(28,19)}=5.6$, $p=0.0001$ respectivamente). De los contrastes ortogonales realizados para estimar las diferencias entre tratamientos se obtiene que a partir del segundo día se encontraron diferencias significativas entre el control y el símil plástico de *P. illinoensis*. Entre el tratamiento con la planta plástica y la planta real las diferencias se encontraron a partir de las 24 horas de comenzado el experimento.

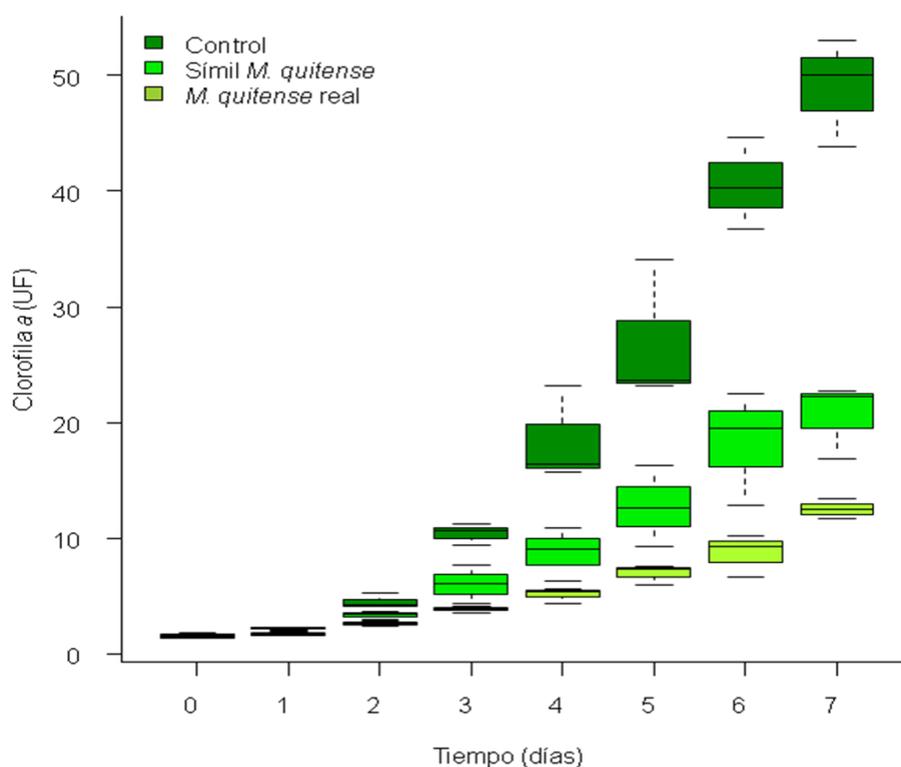


Figura 11. Boxplot del contenido de clorofila *a* en unidades de fluorescencia en el tratamiento de *M. quitense* y sus controles en función del tiempo en el experimento 2. La base y el alto de las cajas representan el primer y tercer cuartil respectivamente, las barras verticales son ± 1.5 veces el rango intercuartilico y la línea horizontal dentro de las cajas indica la mediana.

Tabla 4. Clorofila promedio de los tratamientos en el experimento con *M. quitense* y su error estándar. Se indica el porcentaje de reducción de la biomasa promedio con respecto al control ($F_{(1,4)}=10$, $p=0.0325$). Con letras se muestra los resultados de la prueba de comparación de Tukey (nivel de significancia $p=0.05$).

Tratamiento	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g l}^{-1}$)		Reducción respecto al control (%)
	Inicial	Final	
Control	14.7 ± 1.7	481.7 ± 46.0	-
Símil <i>M. quitense</i>	16.1 ± 1.1	202.8 ± 32.0	52.1 A
<i>M. quitense</i>	16.4 ± 1.6	123.2 ± 8.2	71.8 B

La tasa de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp se vió reducida cuando estuvo presente *M. quitense* o el símil plástico con respecto al control ($F_{(2,6)}=88.36$, $p<0.0001$). La tasa de crecimiento en el control es $0.52 \mu\text{g l}^{-1}\text{día}^{-1}$, en el tratamiento con el símil es $0.39 \mu\text{g l}^{-1}\text{día}^{-1}$ y con la planta real es $0.32 \mu\text{g l}^{-1}\text{día}^{-1}$ (Figura 12). Todas las tasas resultaron estadísticamente diferentes con un test de Tukey a una significancia del 0.05.

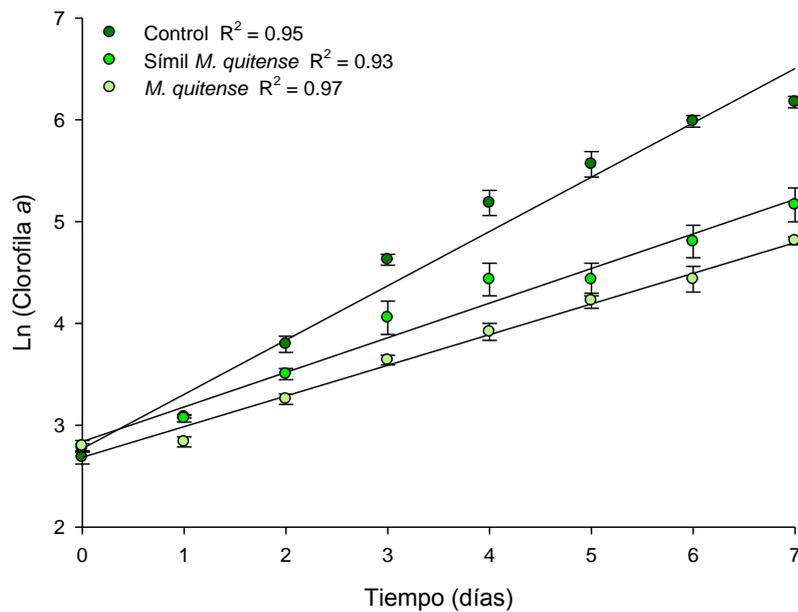


Figura 12. Logaritmo natural del contenido de clorofila *a in situ* (UF) en función del tiempo para cada tratamiento en el experimento con *M. quitense*. Para cada regresión lineal se muestra el coeficiente de determinación (R^2) correspondiente. Los puntos representan las medias del logaritmo de clorofila *a* en cada tiempo y las barras verticales el desvío estándar.

La eficiencia fotosintética del cultivo evaluado a partir de PAM no presentó diferencias significativas a lo largo del tiempo entre los tratamientos, la eficiencia fotosintética registró una media general de 0.700.

Al finalizar el experimento el fósforo reactivo soluble se redujo en promedio un 68%, existiendo diferencias significativas en la reducción de este nutriente entre los tratamientos ($F_{(3,8)}=23.47$, $p=0.0003$; Figura 11a). A partir del test de Tukey se formaron dos grupos, el primero con una media menor (67% de reducción) formado por los tratamientos con plantas reales y el segundo que alcanzó un 94% de reducción constituido por el control y el tratamiento con el símil plástico. El nitrato disuelto al final del experimento se redujo en promedio un 87% con respecto al primer día, la reducción fue estadísticamente diferente entre los tratamientos ($F_{(3,8)}=129.4$, $p<0.0001$; Figura 11b). La reducción de la concentración de amonio (Figura 11c) fue del 91%, y no se registraron diferencias entre los tratamientos.

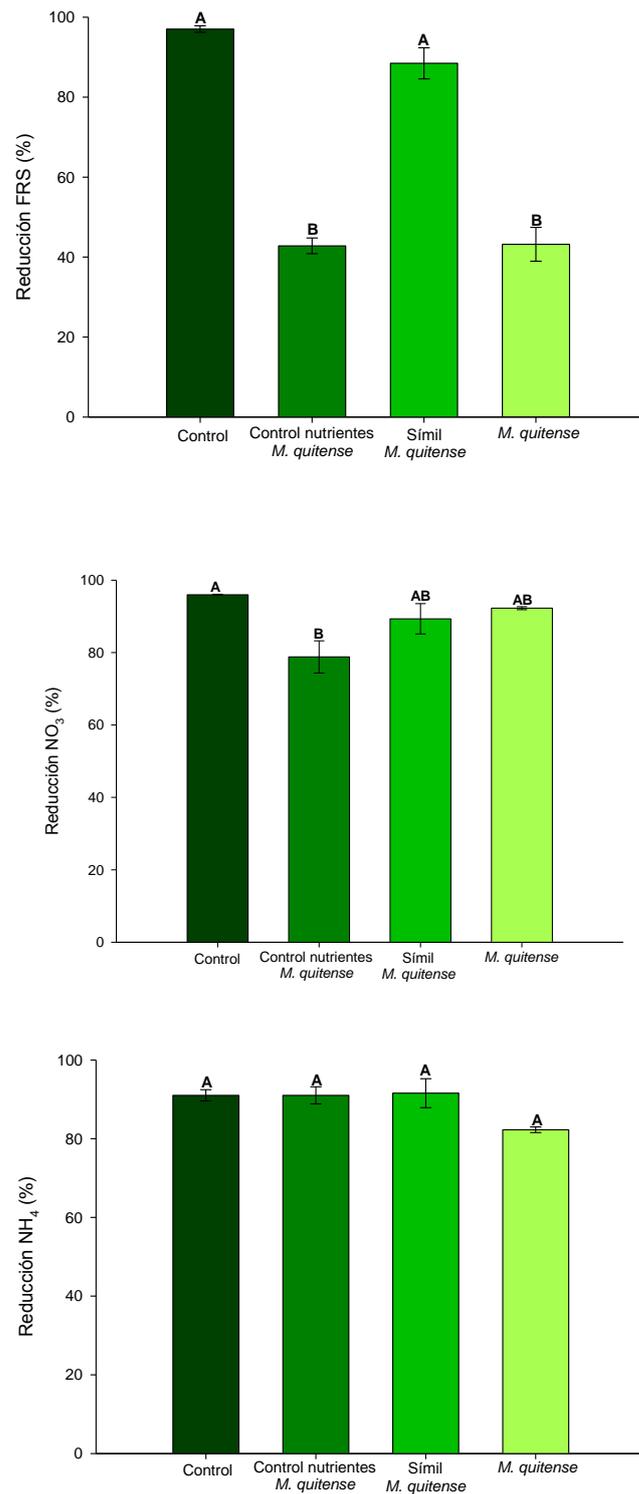


Figura 11. Reducción de la concentración de fósforo reactivo soluble (a), nitrato (b) y amonio (c), con respecto a la concentración inicial en cada tratamiento. Con letras se muestran los resultados de la prueba de comparación de Tukey (nivel de significancia 0.05). Se indican las medias de reducción con su desvío estándar.

Si se toma como referencia la asimilación de nutrientes que realiza el fitoplancton en el control, la biomasa que está presente en el tratamiento con el símil plástico de *M. quitense* debería reducir un 41% del fósforo reactivo soluble, sin embargo reduce el 88% de dicho nutriente. En el tratamiento con *M. quitense* se da una reducción del 43% mientras que dada su biomasa debería reducir el 25% del fósforo reactivo soluble. Con respecto al nitrato disuelto sucede algo similar, dada la biomasa presente en el tratamiento con símil y con la planta real se debería reducir un 40 y 25%, sin embargo se reduce un 89 y 92% respectivamente.

4.5.3 Efecto comparativo de *P. illinoensis* y *M. quitense* sobre *Ankistrodesmus* sp

En el experimento 2 de *P. illinoensis* y el de *M. quitense* se observa el mismo patrón en lo que respecta a la variación de la biomasa de *Ankistrodesmus* sp a lo largo del tiempo. En ambos el control es el que alcanza una mayor biomasa, y se diferencia estadísticamente de los símiles plásticos. En ambos casos se observa el mismo patrón en donde los tratamientos con plantas reales presentan una biomasa menor de fitoplancton que la de sus símiles. La biomasa de *Ankistrodesmus* sp observada con *M. quitense* es estadísticamente diferente que la de *P. illinoensis* desde el día uno al día siete (Figura 12). En el tratamiento con *M. quitense* la biomasa promedio es aproximadamente la mitad que la de *P. illinoensis*. La menor tasa de crecimiento de *Ankistrodesmus* sp se observa cuando *M. quitense* está presente en el medio de cultivo. El efecto del símil plástico de *M. quitense* se diferenció estadísticamente del símil de *P. illinoensis* a partir del día 4 del experimento (Figura 13).

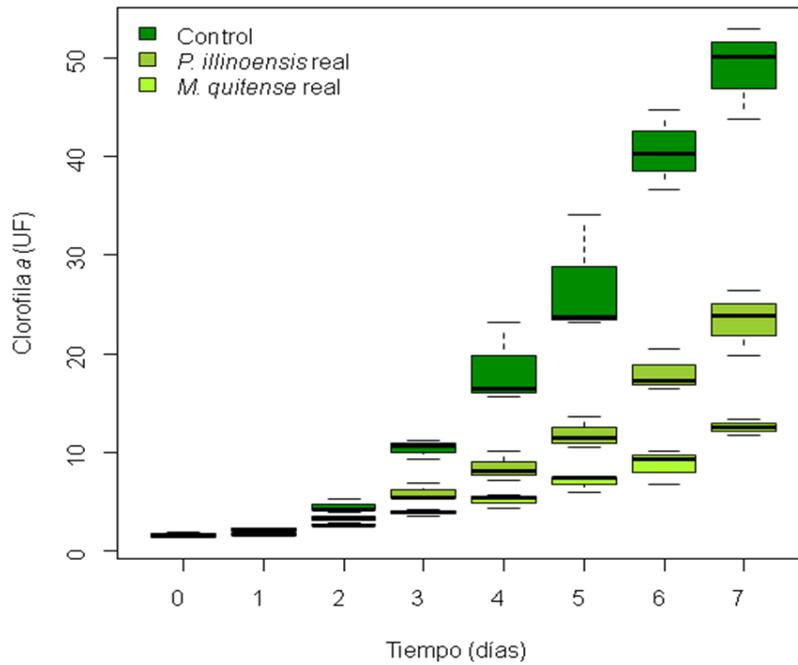


Figura 12. Boxplot del contenido de clorofila *a* en unidades de fluorescencia en los tratamiento con las plantas reales *M. quitense* y *P. illinoensis*, y su control en el experimento 2. La base y el alto de las cajas representan el primer y tercer cuartil respectivamente, las barras verticales son ± 1.5 veces el rango intercuartilico y la línea horizontal dentro de las cajas indica la mediana.

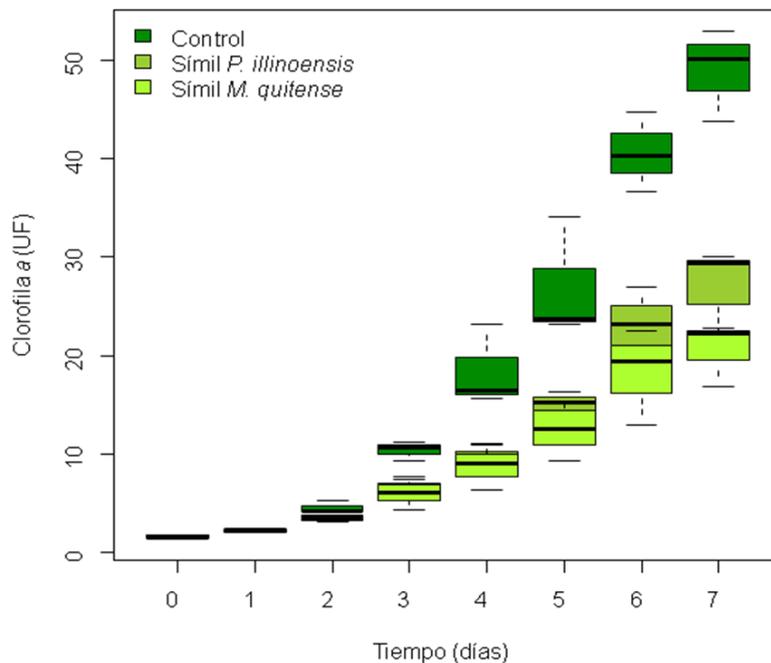


Figura 13. Boxplot del contenido de clorofila *a* en unidades de fluorescencia en los tratamiento con los símiles plásticos de *M. quitense* y *P. illinoensis*, y el control en el experimento 2. La base y el alto de las cajas representan el primer y tercer cuartil respectivamente, las barras verticales son ± 1.5 veces el rango intercuartilico y la línea horizontal dentro de las cajas indica la mediana.

5. DISCUSIÓN

Las plantas acuáticas *P. illinoensis* y *M. quitense* presentan un efecto negativo sobre el crecimiento de la clorofita *Ankistrodesmus* sp. En los ensayos realizados se encuentra el mismo patrón en cuanto a la variación del contenido de clorofila *a* en los distintos tratamientos, el control es el que alcanza la mayor biomasa fitoplanctónica, luego le sigue el símil plástico y por último la planta real. Existen registros sobre el efecto inhibitorio del género *Myriophyllum* (Planas *et al.*, 1981; Jasser, 1995; Gross *et al.*, 1996; Nakai *et al.*, 1999; Nakai *et al.*, 2000; Nakai *et al.*, 2001; Körner & Nicklisch, 2002; Leu *et al.*, 2002) y *Potamogeton* (Jasser, 1995; Wu *et al.*, 2007) sobre el fitoplancton. No existen antecedentes científicos acerca del efecto en particular de *M. quitense* sobre el fitoplancton; sin embargo, los resultados concuerdan con experimentos recientes sobre competencia entre *P. illinoensis* y fitoplancton (Vanderstukken *et al.*, 2011).

La reducción de la biomasa fitoplanctónica puede ser afectada por diversos factores como ser: depredación, sedimentación, disponibilidad de luz, competencia por nutrientes y compuestos alelopáticos (Scheffer *et al.*, 1993). El control por herbivoría que puede realizar el zooplancton sobre el fitoplancton no fue incluido en el presente trabajo.

Uno de los factores que puede afectar negativamente al fitoplancton es el aumento de la sedimentación y la reducción de la resuspensión que sucede entorno a las macrófitas (Jones, 1990; Loseé & Wetzel, 1993; Barko & James, 1997). El efecto causado por la sedimentación probablemente haya ocurrido con igual intensidad en los tratamientos con plantas reales y con los símiles plásticos, además que pudo haber sido contrarrestado por la presencia de oxigenadores de forma continua en los recipientes y por la mezcla diaria del agua en todos los tratamientos. Con respecto a la competencia por el recurso luz, la sombra causada por las macrófitas puede tener un efecto negativo sobre la luz disponible para el fitoplancton (Pokorný *et al.*, 1984; Sand-Jesen, 1989; Ozimek *et al.*, 1990). El efecto de la sombra está fuertemente relacionado con la biomasa de las macrófitas y también con la arquitectura de la especie, la misma biomasa en diferentes especies puede tener efectos distintos en cuanto a la sombra (Sher-Kaul *et al.*, 1995). El coeficiente de extinción de la luz puede variar sustancialmente entre

bancos de macrófitas de distintas especies (Carpenter & Lodge, 1986). Para ambas especies de plantas analizadas, se observaron diferencias significativas en el desarrollo de fitoplancton, estimado como contenido de clorofila *a*, en el tratamiento con las plantas de plástico y el control. El efecto de la estructura de *M. quitense* fue mayor y se diferenció de la de *P. illinoensis* a partir del día cuatro, la hoja disectada de la primera podría tener una capacidad de interceptar la luz mayor que la hoja entera de la segunda.

En los experimentos con *P. illinoensis* y con *M. quitense* se observan diferencias entre los tratamientos con símiles plásticos y con plantas reales, por lo que los datos sugieren la ocurrencia de un factor adicional además de la competencia por la luz.

Las plantas acuáticas pueden competir con el fitoplancton por los nutrientes presentes en la columna de agua (van Donk *et al.*, 1993). Si bien las especies de macrófitas con las que se trabajó son enraizadas, en los tratamientos con plantas reales se observó que las mismas toman una parte de los nutrientes directamente desde la columna de agua. La evidencia experimental indica que las macrófitas no llegaron a disminuir los nutrientes disueltos como para afectar el crecimiento algal, ambos están utilizando el mismo recurso pero en todos los casos se verificó una fase de crecimiento exponencial, por lo que los nutrientes no serían limitantes. Además, el efecto de las plantas no afectó la asimilación de nitrógeno ni fósforo por parte del fitoplancton, dada la biomasa presente en los tratamientos con plantas reales la asimilación de nutrientes fue mayor (por unidad de biomasa) en presencia de plantas que en el control.

La liberación de compuestos alelopáticos por parte de las macrófita es otro mecanismo que puede llevar a la inhibición del crecimiento del fitoplancton (Gopal & Goel, 1993; Hilt & Gross, 2008). Existen registros de sustancias alelopáticas liberadas por especies del género *Myriophyllum* y *Potamogeton* (ej. Nakai *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2007). La evidencia experimental sugiere que la presencia de compuestos alelopáticos en las especies estudiadas podría ser la causante de los patrones de crecimiento observados; siendo el efecto alelopático de *M. quitense* mayor que el de *P. illinoensis*. Los resultados de PAM del fitoplancton no arrojan datos que demuestren efectos adversos con relación a la performance fotosintética del fotosistema II de *Ankistrodesmus* sp en presencia de ninguna de las dos macrófitas estudiadas. Por lo

tanto, la capacidad de asimilar nutrientes y la eficiencia fotosintética no estarían siendo afectadas cuando el fitoplancton está en presencia de ambas especies.

Si bien puede ser dificultoso o a veces incluso imposible determinar los mecanismos causales del control de la biomasa algal por parte de las macrófitas, los resultados demuestran claramente el efecto inhibitorio de las especies estudiadas sobre el crecimiento de la clorofita *Ankistrodesmus* sp, al menos en las condiciones experimentales y durante un período corto

Por el momento no es posible identificar el aleloquímico ni su modo de acción. Se propone para una futura investigación la purificación de compuestos alelopáticamente activos a partir de extractos o exudados de ambas especies. También sería de interés estudiar en lagos cuál es el efecto de estas especies sobre comunidades naturales de fitoplancton, comparando la composición y estructura microalgal en los bancos de plantas y en aguas abiertas.

Es importante destacar el efecto que pueden causar las macrófitas estudiadas en el crecimiento del fitoplancton en ausencia de herbívoros (principalmente zooplanctónicos). Esta situación es particularmente relevante en regiones cálidas en donde existe una baja presión de depredación por parte del zooplancton en los bancos de plantas (Meerhoff *et al.*, 2007; Kosten *et al.*, 2009). La evidencia presentada experimentalmente por Vanderskuppen *et al.* (2011) y Kosten *et al.* (2009) sugiere que solamente los mecanismos de interacción directa entre las macrófitas y el fitoplancton podrían ser suficientes para establecer estados de agua clara, incluso en escenarios de ausencia de medianos y grandes herbívoros. La evidencia aportada en la presente investigación concuerda con la afirmación anterior, y sería de interés continuar con experimentos y muestreos que complementen lo observado, e incorporar diferentes métodos para probar efectos alelopáticos, como por ejemplo: experimentos en bancos de plantas presentes en lagos, obtener extractos de las macrófitas y la utilización de bolsas de diálisis. Se plantea estudiar además como es el efecto de las macrófitas a diferente biomasa, cuál es la biomasa necesaria para observar un efecto de inhibición, estudiar si el efecto inhibitorio sobre el fitoplancton varía según el estado fisiológico de las plantas, y tal vez realizar experimentos en laboratorio a diferente temperatura para observar cual

es el efecto de estas especies y si es posible relacionarlo con lo observado en diferentes climas.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alonso-Paz E. (1997). Plantas acuáticas de los humedales del este. Programa de conservación de la biodiversidad y desarrollo sustentable en los humedales del este, Montevideo, Uruguay.

Arnau J. & Bono R. (2008). Estudios longitudinales. Modelos de diseño y análisis. *Escritos de psicología*, 2(1): 32-41.

Barko J.W. & James W.F. (1997). Effects of submerged aquatic macrophytes on nutrient dynamics, sedimentation, and resuspension. En: Jeppesen E., Søndergaard M., Søndergaard M., Christoffersen K. (Eds.), *The Structuring Role of Submerged Macrophytes in Lakes*, Springer, pp. 197-214.

Beisner B.E., Haydon D.T. & Cuddington K. (2003). Alternative stable states in ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1 (7): 376–382.

Blindow I. (1992). Decline of charophytes during eutrophication: Comparison with angiosperms. *Freshwater Biology*, 28: 9–14.

Blindow I. & Hootsmans M.J.M. (1991). Allelopathic effects from *Chara* spp. on two species of unicellular green algae. En: Hootsmans M.J.M. & Vermaat J.E. (Eds.), *Macrophytes, a key to understanding changes caused by eutrophication in shallow fresh water ecosystems*. Institute for Hydraulic and Environmental Engineering, IHE, Delft, The Netherlands, pp.139–144.

Burks R.L., Lodge D.M., Jeppesen E. & Lauridsen T.L. (2002). Diel horizontal migration of zooplankton: costs and benefits of inhabiting the littoral. *Freshwater Biology*, 47: 343–365.

Bourrelly P. (1966). *Les algues d'eau douce, Initiation à la systématique*. Tome I: Les Algues Vertes. Éditions N. Bpubées & Cie. Place Saint-Andr e-des-arts, Paris-Vie.

Carpenter S.R. & Lodge D.M. (1986). Effects of submersed macrophytes on ecosystem processes. *Aquatic Botany*, 26: 341–370.

De los Santos J., Mazzeo N., Inda H., García-Rodríguez F., Goyenola G., Iglesias C., Fosalba C., Garcia S., Teixeira de Mello F., Clemente J., Vianna M., Pacheco J.P., Vidal N., Schipilov A., Maldonado S., Alonso J., Faure J., Bellon D., Valena J., Guimaraens M., Sapriza G. & Pacheco F. (2008). Diseño de estrategias para recuperar Laguna del Diario de acuerdo a sus usos actuales. Proyecto PDT 36/12.

Folke C., Carpenter S., Walker B., Scheffer M., Elmqvist T., Gunderson L. & Holling C.S. (2004). Regime shifts, resilience, and biodiversity in ecosystem management. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 35: 57–81.

Gopal B. & Goel U. (1993). Competition and allelopathy in aquatic plant communities. *Botanical Review*, 59: 155–210.

Gotelli N.J. & Ellison A.M. (2004). *A primer of ecological statistics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.

Gross E.M., Meyer H. & Schilling G. (1996). Release and ecological impact of algicidal hydrolyzable polyphenols in *Myriophyllum spicatum*. *Phytochemistry*, 41: 133–138.

Gross E.M. (2003). Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical reviews in plant sciences*, 22 (3): 313–339.

Gross E.M., Hilt S., Lombardo P. & Mulderij G. (2007). Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton – state of the art and open questions. *Hydrobiologia*, 584: 77-88.

Haynes R.R. (1985). A revision of the clasping-leaved *Potamogeton* (Potamogetonaceae). *Sida, Forth Worth*, 11 (2): 173-188.

Henderson C. R. (1975). Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics*, 31: 423-447.

Henderson C. R. (1986). Recent developments in variance and covariance estimation. *Journal of animal sciences*, 63: 208-216.

Hilt S. & Gross E.M. (2008). Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes? *Basic and applied ecology*, 9: 422–432.

Holling C.S. (1973). Resilience and stability of ecological systems. *Annual review of ecology and systematics*, 4: 1–23.

Jasser I. (1995). The influence of macrophytes on a phytoplankton community in experimental conditions. *Hydrobiologia*, 306: 21–32.

Jeppesen E, Søndergaard M, Søndergaard M. & Christoffersen K. (1997). *Structuring role of submerged macrophytes in lakes*. Heidelberg: Springer.

Jeppesen E., Søndergaard M., Søndergaard M. & Christoffersen K. (1998a). *The structuring role of submerged macrophytes in lakes*. Springer-Verlag.

Jeppesen E., Søndergaard M., Jensen J.P., Mortensen E. & Jørgensen T. (1998b). Cascading trophic interactions from fish to bacteria and nutrients after reduced sewage loading: an 18-year study of a shallow hypertrophic lake. *Ecosystems*, 1: 250–267.

Jones R.C. (1990). The effect of submersed aquatic vegetation on phytoplankton and water-quality in the tidal fresh-water potomac river. *Journal of freshwater ecology*, 5: 279–288.

Kadono Y. (1982). Distribution and habitat of Japanese *Potamogeton*. *Botanica magazine, Tokyo*, 95: 63-76.

Keselman H. J., Algina J., Kowalchuk R. K. & Wolfinger R. D. (1999). A comparison of recent approaches to the analysis of repeated measurements. *British journal of mathematical and statistical psychology*, 52: 63-78.

Kogan S.I. & Chinnova G.A. (1972). Relations between *Ceratophyllum demersum* (L.) and some blue-green algae. *Hydrobiological journal*, 8: 14–19.

Körner S. & Nicklisch A. (2002). Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *Journal of Phycology*, 38: 862–871.

Koroleff F. (1970). Revised version of direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *Int. Con. Explor. Sea C.M. 1969/C9. ICES, Information on techniques and methods for sea water analysis. Interlab. Rep. 3: 19-22.*

Kosten S., Lacerot G., Jeppesen E., da Motta Marques D., van Nes E.H., Mazzeo N., Scheffer M. (2009). Effects of submerged vegetation on water clarity across climates. *Ecosystems*, 12: 1117-1129.

Kowalchuk R. K., Keselman H. J., Algina J. & Wolfinger R. D. (2004). The analysis of repeated measurements with mixed-model adjusted F tests. *Educational and psychological measurement*, 64: 224-242.

Kruk C., Rodriguez-Gallego L., Meerhoff M., Quintans F., Lacerot G., Mazzeo N. (2009) Determinants of biodiversity in subtropical shallow lakes (Atlantic coast, Uruguay). *Freshwater biology*, 54: 2628–2641.

Kufel L. & Ozimek T. (1994). Can *Chara* control phosphorus cycling in Lake Luknajno (Poland)? *Hydrobiologia*, 275/276: 277–283.

Leu E., Krieger-Liszkay A., Goussias C. & Gross E.M. (2002). Polyphenolic allelochemicals from the aquatic angiosperm *Myriophyllum spicatum* L. inhibit photosystem II. *Plant physiology*, 130: 2011–2018.

- Littell R. C., Henry P. R & Ammerman C. B. (1998). Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal of Animal Science*, 76: 1216-1231.
- Littell R.C, Pendergast J. & Natarajan R. (2000). Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Statistics in medicine*, 19: 1793-1819.
- Littell R. C., Milliken G.A, Stroup W.W., Wolfinger R.D & Schabenberger O. (2006). SAS© for mixed models, Second Edition. Cary, NC: SAS Institute, Inc.
- Loseé R.F. & Wetzel R.G. (1993). Littoral flow-rates within and around submersed macrophyte communities. *Freshwater Biology*, 29: 7–17.
- Maxwell K. & Johnson G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence, a practical guide. Review article. *Journal of Experimental Botany*, 51 (345): 659-668.
- May R.M. (1977). Thresholds and breakpoints in ecosystems with a multiplicity of stable states. *Nature*, 269: 471–7.
- Meerhoff M., Clemente J.M., de Mello F.T., Iglesias C., Pedersen A.R., Jeppesen E. (2007). Can warm climate-related structure of littoral predator assemblies weaken the clear water state in shallow lakes? *Global Change Biology*, 13:1888–97.
- Mjelde M. & Faafeng B.A. (1997). *Ceratophyllum demersum* hampers phytoplankton development in some small Norwegian lakes over a wide range of phosphorus concentrations and geographical latitude. *Freshwater biology*, 37: 355-365.
- Molisch H. (1937). Der Einfluss einer Pflanze auf die andere–Allelopathie. Fischer, Jena.
- Mulderij G., Mooij W.M., Smolders A.J.P. & Van Donk E. (2005) Allelopathic inhibition of phytoplankton by exudates from *Stratiotes aloides*. *Aquatic botany*, 82: 284–296.
- Müller R. & Widemann O. (1955). Die Bestimmung des Nitrat-Ions in Wasser. *Von Wasser* 22: 247.
- Murphy J. & Riley J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical chemical acta* 27: 31–36.
- Nakai S., Inoue Y., Hosomi M. & Murakami A. (1999). Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Water science and technology*, 39: 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*, 34: 3026–3032.

Nakai, S., Inoue, Y., & Hosomi, M. (2001). Allelopathic effects of polyphenols released by *Myriophyllum spicatum* on the growth of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Allelopathy journal*, 8: 201–210.

Nusch E.A. (1980) Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Archivfür hydrobiologie bitrage ergebnisse der limnologie*, 14: 14–36.

Ozimek T, Gulati R.D. & van Donk E. (1990). Can macrophytes be useful in biomanipulation of lakes? The Lake Zwemlust example. *Hydrobiologia*, 1: 399-407.

Planas D., Sarhan F., Dube L., Godmaire H. & Cadieux C. (1981). Ecological significance of phenolic compounds of *Myriophyllum spicatum*. *Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie*, 21: 1492–1496.

Pokorný J., Kvet J., Ondok J.P., Toul Z. & Ostry I. (1984). Production ecological analysis of a plant community dominated by *Elodea canadensis* Michx. *Aquatic botany*, 19: 263–292.

Rodrigues R.S. & Irgang B.E. (2001). Potamogetonaceae Dumort, no Rios Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Serie Botánica, Puerto Alegre*, 56 (10): 3-49.

Sand-Jensen K. (1989). Environmental variables and their effect on photosynthesis of aquatic plant communities. *Aquatic Botany*, 34 (1-2): 5-25.

Scheffer M., Hosper S.H., Meijer M.L., Moss B. & Jeppesen E. (1993). Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends in Ecology and Evolution*, 8: 275–279.

Scheffer M, Carpenter S.R., Foley J., Folke C. & Walker B.H. (2001). Catastrophic shifts in ecosystems. *Nature*, 413: 591–96.

Scheffer M. & Carpenter S.R. (2003). Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observations. *Trends in ecology and evolution*, 18 (12): 648-656.

Schroder A., Persson L. & De Roos A.M. (2005). Direct experimental evidence for alternative stable states: a review. *OIKOS*, 110: 3-19.

Sculthorpe C.D. (1967). *The biology of aquatic vascular plants*. London: Edward Arnold, 610 pp.

Sher-Kaul, S., B. Oertli, E. Castella and J. B. Lachavanne. 1995. Relationship between biomass and surface area of six submerged aquatic plant species. *Aquatic botany*, 51: 147-154.

Tur N.M. (1982). Revisión del género *Potamogeton* L. en la Argentina. *Darwiniana, San Isidro*, 24 (1-4): 217-265.

- Valderrama J.C. (1981). The simultaneous analysis of total N and P in natural waters. *Marine Chemistry*, 10: 1009–1022.
- Vanderstukken M., Mazzeo N., van Colen W., Declerck S.A.J. & Muylaert K. (2011). Biological control of phytoplankton by the subtropical submerged macrophytes *Egeria densa* and *Potamogeton illinoensis*: a mesocosm study. *Freshwater Biology*, 56 (9): 1837–1849.
- van Donk E., Gulati R.D., Iedema A. & Meulemans J.T. (1993). Macrophyte-related shifts in the nitrogen and phosphorus contents of the different trophic levels in a biomanipulated shallow lake. *Hydrobiologia*, 251: 19–26.
- van Donk E. & Van de Bund W.J. (2002). Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms. *Aquatic Botany*, 72: 261–274.
- Verbeke G. & Molenberghs G. (2000). Linear mixed models for longitudinal data, New York: Springer.
- Wiegleb, G. & Kaplan Z. (1998). An account of the species of *Potamogeton* L. (Potamogetonaceae). *Folia Geobotanica*, 33: 241–316.
- Willis R.J. (1985). The historical bases of the concept of allelopathy. *J. Hist. Biol.* 18: 71–102.
- Wium-Andersen S. (1987). Allelopathy among aquatic plants. *Archiv für Hydrobiologie, Beihefte Ergebnisse der Limnologie*, 27: 167–172.
- Wium-Andersen S., Anthoni U., Christophersen C. & Houen G. (1982). Allelopathic effects on phytoplankton by substances isolated from aquatic macrophytes (Charales). *Oikos*, 39: 187–190.
- Wium-Andersen S., Anthoni U. & Houen G. (1983). Elemental sulphur, a possible allelopathic compound from *Ceratophyllum demersum*. *Phytochemistry*, 22: 2613.
- Wu Z., Deng P., Wu X., Luo S. & Gao Y. (2007). Allelopathic effects of the submerged macrophyte *Potamogeton malaianus* on *Scenedesmus obliquus*. *Hidrobiología*, 592: 465–474.
- Zhang D. (2004). Generalized linear mixed models with varying coefficients for longitudinal data. *Biometrics*, 60: 8–15.

7. ANEXO

Análisis de medidas repetidas en el tiempo

Cuando se realizan experimentos en los que se mide una variable sobre la misma unidad experimental a lo largo del tiempo se obtienen mediciones seriales, también llamadas datos longitudinales, que se caracterizan por estar frecuentemente correlacionadas (Littell *et al.*, 2000). Existen diferentes abordajes para el análisis de medidas repetidas en el tiempo, desde la más simple a la más compleja, estas estrategias son: a) el análisis por separado de cada intervalo de tiempo, b) el análisis univariado de la varianza en un tiempo de interés (parcelas divididas en el tiempo, ANOVA), c) el análisis multivariado de la varianza (MANOVA) y d) los métodos basados en los modelos mixtos (Littell *et al.*, 1998; Keselman *et al.*, 1999). El análisis por separado de cada punto de tiempo no requiere procedimientos especiales, ya que se realiza un análisis de varianza de forma independiente en cada momento, pero no se considera el posible efecto del tiempo, siendo su inferencia limitada, no logrando obtener conclusiones generales.

En el análisis de datos longitudinales se debe considerar la posible correlación entre las medidas repetidas, las medidas más cercanas en el tiempo han de estar más correlacionadas que las más lejanas (Verbeke & Molenberghs, 2009). Ignorar o evitar la estructura de covarianza puede llevar a inferencias inválidas (Zhang, 2004). Las correlaciones que existen entre las observaciones de la misma unidad experimental quedan reflejadas en la matriz de covarianza, y no todos los modelos estadísticos parten de los mismos supuestos con respecto a esta estructura.

Los procedimientos clásicos, como el análisis univariado y el análisis multivariado, evitan el problema de la correlación y no lo afrontan de forma directa. El análisis univariado tradicional asume que las medidas no están correlacionadas en el tiempo, dispone de una estructura de covarianza altamente restringida con menos parámetros a estimar. Es una técnica más eficiente y potente para detectar el efecto de los tratamientos si se cumple con el supuesto de independencia de las mediciones. Por otra parte, en el análisis multivariado la matriz de covarianza no queda restringida, las

varianzas y covarianzas de medidas repetidas pueden tomar cualquier valor, de modo que el procedimiento puede ser ineficiente dada la gran cantidad de parámetros a estimar. Por lo tanto el análisis univariado resulta muy restringido y el multivariado altamente liberal (Arnau & Bono, 2008). Si bien estos tipos de análisis son sencillos y potentes, en la mayoría de los casos no se cumplen los supuestos que los mismos asumen.

Por el contrario, los modelos lineales mixtos afrontan de forma directa el problema relativo a la modelación de la estructura de covarianza. Es posible evaluar el ajuste de modelos con diferentes estructuras, y hacer inferencias a partir del modelo que mejor se ajuste a los datos. “El modelado exacto de la estructura de covarianza es una importante consideración para los investigadores aplicados dado que un incremento en la precisión al estimar las estructuras de covarianza produce un incremento en la potencia estadística para detectar los efectos de los tratamientos” (Kowalchuk *et al.*, 2004, p.224).

El análisis univariado y multivariado para datos longitudinales presenta serias limitaciones ya que requieren datos balanceados y completos por medida. En modelos mixtos cuando alguna unidad experimental no posee todas las observaciones realizadas al conjunto, no por ello debe ser eliminada, es posible trabajar con datos faltantes, esta es una clara ventaja en comparación con el resto de los abordajes. Además los modelos mixtos permiten analizar los datos de forma correcta cuando las mediciones se realizaron a intervalos no constantes (Arnau & Bono, 2008).

Los modelos mixtos son modelos estadísticos que se constituyen de efectos fijos y aleatorios, los mismos fueron propuestos originalmente para aplicaciones en genética animal (Henderson, 1975, 1986). En un efecto fijo se considera que los niveles utilizados son los únicos que son de interés, y las inferencias que se realizan están restringidas a los niveles planteados (Gotelli & Ellison, 2004). En un efecto aleatorio los niveles representan una muestra aleatoria de todos los posibles niveles, y se plantean cuando se quieren estimar componentes de varianza. Los modelos mixtos estiman tanto los valores esperados de las observaciones (efectos fijos) como las varianzas y covarianzas de las observaciones (efectos aleatorios), de esta forma es posible modelar

las correlaciones de datos longitudinales de forma correcta, eligiendo la estructuras de correlación que mejor se ajuste al caso de estudio (Littell *et al.*, 2006).

8. AGRADECIMIENTOS

Primero y principal, quisiera agradecer enormemente a mi familia por apoyarme siempre, por estar en todo momento durante toda la carrera y en la pasantía, en la preparación de todos los exámenes, por irme a buscar a cualquier hora al laboratorio, por acompañarme hasta los fines de semana, por estar siempre y por todo el amor que me dan. Gracias ma, pa y Lety ☺

Quiero agradecerle a Néstor porque aprendí mucho junto a él, a Mariana Meerhoff y Claudia Rodríguez por sus correcciones y comentarios del manuscrito; y a los que me ayudaron en el laboratorio y en las salidas de campo, Sole García, Juan Pablo Pacheco, Nico Vidal, Mariana Vianna, Guillermo Goyenola y Gabriela Eguren. También quiero agradecer a mis compañeros del DBEC (Departamento de Estadística, Biometría y Estadística) de Facultad de Agronomía, en especial a Lucía Gutiérrez por su apoyo, por darme el impulso en momentos difíciles y por enseñarme tantas cosas.