



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ALELOQUÍMICO DE LA MACROFITA
Phragmites australis **BAJO CONDICIONES DE CRECIMIENTO EN**
LABORATORIO Y AMBIENTAL SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESPECIES DEL
FITOPLANCTON

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. DAVID CHICALOTE CASTILLO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. NANDINI SARMA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Los Reyes Iztacala, Estado de México, Septiembre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ALELOQUÍMICO DE LA MACROFITA
Phragmites australis **BAJO CONDICIONES DE CRECIMIENTO EN**
LABORATORIO Y AMBIENTAL SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESPECIES DEL
FITOPLANCTON

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. DAVID CHICALOTE CASTILLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR:
DRA. NANDINI SARMA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/304/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **20 de septiembre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **CHICALOTE CASTILLO DAVID** con número de cuenta **97333500** con la tesis titulada "**Determinación del potencial aleloquímico de la macrofitas *Phragmites australis* bajo condiciones de crecimiento en laboratorio y ambiental sobre el crecimiento de especies del fitoplancton.**", realizada bajo la dirección del **DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ
Vocal: DRA. MARTHA LYDIA MACIAS RUBALCAVA
Vocal: DR. EBERTO NOVELO MALDONADO
Vocal: DRA. MARTHA MARTÍNEZ GARCÍA
Secretario: DRA. NANDINI SARMA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 29 de marzo de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas (PCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico otorgado a través de la beca para estudios de posgrado.

A los miembros de mi comité tutor, al Dr. Pedro Ramírez García (tutor principal), a la Dra. Nandini Sarma y al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, por aceptar la dirección de esta tesis. Así como a sus valiosas observaciones y sugerencias para mejorar el presente trabajo y ser ejemplo profesional del quehacer científico para contribuir al desarrollo de México.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava del Departamento de Química de Productos Naturales del Instituto de Química, UNAM, por ser pilar fundamental en el desarrollo de esta investigación. Por su apoyo y ahínco en el desarrollo de métodos y análisis químico, su colaboración fue un invaluable aporte tanto en mi formación académica como profesional.

Al Instituto de Química y en este, al Laboratorio de Cromatografía de Gases y Líquidos (M. en C. Lucía del Carmen Márquez, Jefa de Sección. Q. Eréndira García Ríos, Analista y M. en C. Lucero Rios Ruiz, Analista), al Laboratorio Espectrometría de Masas (Dra. María del Carmen García González, Jefa de sección y Dr. Francisco Javier Pérez Flores) y en particular al Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural, LANCIC (M. en C. Everardo Tapia Mendoza), por su colaboración en el análisis químico de las muestras evaluadas en el presente estudio.

Al Dr. Sarma SSS del Laboratorio de Zoología Acuática, FES Iztacala, UNAM, por sus valiosas sugerencias y revisión de los manuscritos derivados de este trabajo de grado.

A la M. en C. Martha Gaytan Herrera por tu gran compromiso de enseñanza al inicio de este trabajo, y luego por ser una gran amistad en el ámbito profesional. Asimismo a Georgina García Morán por tu dedicación y gran trabajo en la asesoría administrativa y trámites del Programa de Posgrado en Biología. Sobre todo por tu amistad y apoyo profesional.

A mis padres, María Felix Castillo y Carlos Chicalote García, por todo su amor y comprensión. Ustedes son las personas a las que yo más admiro. Son mi ejemplo de tenacidad, fuerza, pasión y humildad. Gracias por estar junto a mí.

A mis hermanos, Carlos, Roxana y Ricardo, por ser inspiración de superación, trabajo en equipo y dedicación.

A mis amigos del alma por acompañarme en este trayecto, por compartir su alegría, su tiempo y ser muestra de pasión y entrega por el quehacer científico, dedicación al estudio y avidez por destacar en el ámbito profesional; Perla, Alejandra, Elizabeth, David-Ricardo, Adriana, Gisela, Jane, Margarita, Lupita y Anita. En la culminación de esta etapa académica, a Diana. Tu interés y curiosidad por las ciencias aviva en mí el seguir aprendiendo. ¡Llevaré en mi corazón todos aquellos momentos compartidos con ustedes!

A la “Secre”, que aunque no es humano, es la *Felis catus* oscurita más linda. Su inesperada llegada a mi vida ha dado inmensa alegría a mis días. Más allá de este proceso, su esencia silvestre ha acompañado mis sesiones académicas nocturnas.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bacteriología en la FESI y del I.Q. en el Laboratorio de Productos Naturales.

A todos aquellos que compartieron conmigo momentos, debates, anécdotas, etc. de manera profesional, académica y fuera de lo escolar.

DEDICATORIA

*A mis maestros de vida,
mis padres y hermano*

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 2. ANTECEDENTES | 7 |
| 2.1. El concepto de “alelopatía”..... | 7 |
| 2.2 Alelopatía en sistemas acuáticos..... | 10 |
| 2.3 Alelopatía por macrofitas..... | 15 |
| 2.4 Escenario del efecto alelopático de macrofitas sobre especies del fitoplancton..... | 18 |
| 2.5 Efecto de los factores ambientales en la respuesta alelopática..... | 19 |
| 2.6 Metabolitos secundarios con actividad alelopática en macrofitas..... | 21 |
| 2.7 Metabolitos secundarios con actividad alelopática del género <i>Phragmites</i> | 26 |
| 2.7.1 Ácidos orgánicos..... | 26 |
| 2.7.2 Terpenoides..... | 27 |
| 2.7.3 Fenoles..... | 29 |
| 2.8 Problemática de florecimientos algales por cianobacterias en los sistemas acuáticos..... | 33 |
| 2.9 El papel de las macrofitas en el estudio de la alelopatía..... | 37 |
| 2.10 Alelopatía de macrofitas sumergibles y flotantes..... | 38 |
| 2.11 Alelopatía de macrofitas emergentes..... | 40 |
| 2.12 Problemática de cianobacterias en el embalse de Valle de Bravo y uso de macrofitas para la rehabilitación de cuerpos de agua..... | 44 |
| 3. OBJETIVO GENERAL | 46 |
| 3.1 Objetivos particulares..... | 46 |
| 4. HIPÓTESIS | 48 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1 Obtención de organismos..... | 49 |
| 5.1.1 <i>Phragmites australis</i> | 49 |
| 5.1.2 <i>Microcystis aeruginosa</i> y <i>Tetradesmus obliquus</i> | 52 |
| 5.2 Determinación y comparación del contenido de fenoles totales en órganos vegetales y exudados de <i>Phragmites australis</i> bajo tres condiciones de crecimiento..... | 53 |
| 5.2.1 <i>Phragmites australis</i> bajo condiciones de crecimiento en laboratorio..... | 53 |
| 5.2.2 <i>Phragmites australis</i> bajo condiciones de crecimiento ambiental..... | 56 |
| 5.3 Obtención de extractos..... | 57 |
| 5.3.1 Extractos acuosos..... | 57 |
| 5.3.2 Extractos acuosos / extractos orgánicos..... | 58 |
| 5.3.3 Extractos orgánicos con disolventes de diferente polaridad..... | 59 |
| 5.4 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu..... | 59 |
| 5.5 Determinación de la presencia de fenoles con potencial alelopático..... | 60 |
| 5.5.1 Identificación por cromatografía en capa fina..... | 60 |
| 5.5.2 Identificación por espectrometría de masas..... | 60 |
| 5.5.3 Identificación por cromatografía líquida de alta eficacia..... | 61 |
| 5.6 Determinación del perfil químico de los compuestos orgánicos volátiles presentes en <i>Phragmites australis</i> | 62 |
| 5.5 Evaluación de la inhibición de los extractos acuosos de <i>Phragmites australis</i> sobre <i>Microcystis aeruginosa</i> y <i>Tetradesmus obliquus</i> | 63 |
| 5.6 Evaluación del potencial alelopático de <i>Phragmites australis</i> sobre especies del fitoplancton del embalse de Valle de Bravo..... | 63 |
| 5.7 Manejo de Datos..... | 66 |
| 5.8 Análisis estadísticos..... | 67 |
| 6. RESULTADOS..... | 69 |
| 6.1 Porcentaje de rendimiento en la obtención de extractos en <i>Phragmites australis</i> | 69 |
| 6.2 Fenoles totales en <i>Phragmites australis</i> | 70 |

| | |
|---|-----|
| 6.2.1 Fenoles totales en extractos acuosos de <i>Phragmites australis</i> | 70 |
| 6.2.2 Fenoles totales en extractos orgánicos de <i>Phragmites australis</i> | 73 |
| 6.2.3 Fenoles totales en exudados de <i>Phragmites australis</i> | 76 |
| 6.3 Asimilación de nutrientes y producción de fenoles totales en <i>Phragmites australis</i> en condiciones de crecimiento de laboratorio..... | 78 |
| 6.4 Efecto alelopático de los extractos acuosos de <i>Phragmites australis</i> sobre el crecimiento de <i>Microcystis aeruginosa</i> y <i>Tetrademus obliquus</i> | 79 |
| 6.5 Perfil químico de compuestos de naturaleza fenólica en los extractos de <i>Phragmites australis</i> | 82 |
| 6.6 Evaluación del efecto alelopático de <i>Phragmites</i> en un sistema de isla flotante con macrofitas (IFM) en el embalse de Valle de Bravo sobre especies del fitoplancton..... | 86 |
| 7. DISCUSIÓN | 98 |
| 7.1 Contenido de FT en <i>Phragmites australis</i> | 98 |
| 7.2 Efecto de la disminución de irradiancia luminosa y nutrientes en <i>Phragmites</i> | 99 |
| 7.3 Efecto alelopático de <i>Phragmites australis</i> sobre <i>Microcystis aeruginosa</i> y <i>Tetrademus obliquus</i> | 101 |
| 7.4 Efecto de <i>Phragmites australis</i> ambiental crecida en el embalse de Valle de Bravo..... | 103 |
| 8. CONCLUSIONES | 113 |
| 9. PERSPECTIVAS | 115 |
| 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 116 |
| ANEXO 1 | 131 |
| Artículo de requisito..... | 131 |
| Chicalote-Castillo, D., Ramirez-Garcia, P., & Macías-Rubalcava, M. L. (2017). Allelopathic effects among selected species of phytoplankton and macrophytes. <i>Journal of Environmental Biology</i> , 38(6), 1221-1227..... | 131 |
| ANEXO 2 | 138 |

Compuestos orgánicos volátiles de *Phragmites*..... 138

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Diagrama de una célula del sistema radicular del género <i>Phragmites</i> | 12 |
| Figura 2. Mecanismos celulares involucrados en la respuesta alelopática en células de macrofitas bajo condiciones de limitación de nitrógeno y fósforo..... | 21 |
| Figura 3. Estructura química de los ácidos orgánicos con actividad antimicrobiana y alelopática en <i>Phragmites</i> | 27 |
| Figura 4. Estructura química de los triterpenos con actividad alelopática..... | 28 |
| Figura 5. Esquema resumido de la síntesis de terpenos a partir de isoprenoides... | 29 |
| Figura 6. Clasificación del grupo de los fenoles..... | 32 |
| Figura 7. Estructura química de algunos fenoles evaluados en bioensayos que presentan actividad alelopática sobre cianobacterias..... | 33 |
| Figura 8. Estructura química general de la microcistina..... | 36 |
| Figura 9. Mapa de ubicación de <i>Phragmites</i> | 50 |
| Figura 10. Crecimiento de <i>Phragmites</i> en invernadero FESI..... | 52 |
| Figura 11. Esquema de diseño experimental..... | 55 |
| Figura 12. Diseño de la estructura de isla flotante con macrofitas..... | 57 |
| Figura 13. Cuantificación de la concentración de FT en <i>Phragmites</i> | 73 |
| Figura 14. Cuantificación de la concentración de FT en <i>P. australis</i> en las tres condiciones de crecimiento, PhgL C, PhgL E y PhgA. | 75 |
| Figura 15. Cuantificación de la concentración de FT en los exudados liberados al medio acuoso por <i>P. australis</i> , en las tres condiciones de crecimiento, PhgL C, PhgL E y PhgA. | 77 |
| Figura 16. Tasa de consumo de nitrógeno y fósforo en <i>P. australis</i> en condición de crecimiento en laboratorio, PhgL C, PhgL E y su cuantificación de FT..... | 79 |
| Figura 17. Efecto alelopático de <i>P. australis</i> . Macrofitas bajo crecimiento de laboratorio en condiciones óptimas de nutrientes y radiación luminosa como PhgL C..... | 81 |
| Figura 18. Cuadro de bigotes de descriptores hidrológicos de la calidad del agua relacionados con el estado trófico del embalse. | 93 |

| | |
|--|-----|
| Figura 19. Abundancia relativa de fitoplancton. Las especies fueron categorizadas en Phylum taxonómico para el sitio control y la IFM. | 94 |
| Figura 20. Variables biológicas asociadas a la presencia de cianobacterias. | 96 |
| Figura 21. Densidad celular estacional de las cinco especies de cianobacterias potencialmente tóxicas con mayor recurrencia encontrada en los sitios control y IFM. | 100 |
| Figura 22. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) en el sitio control e IFM..... | 102 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Macrofitas emergentes con efecto alelopático sobre organismos del fitoplancton..... | 24 |
| Cuadro 2. Porcentaje de rendimiento en la obtención de extractos acuosos (Ext. Acuo.) en <i>P. australis</i> | 69 |
| Cuadro 3. Porcentaje de rendimiento en la obtención de extractos acuosos y extractos organicos en <i>P. australis</i> | 70 |
| Cuadro 4. Registro de la concentración de FT y su comparación entre los órganos vegetales de la macrofita <i>Phragmites</i> en las tres condiciones de crecimiento | 72 |
| Cuadro 5. Análisis comparativo ANOVA (dos vías, con medidas repetidas) del efecto de las tres condiciones de crecimiento (PhgL C, PhgL E y PhgA) en <i>P. australis</i> y sus órganos vegetales sobre la concentración de FT..... | 73 |
| Cuadro 6. Cuantificación de la concentración de FT en los tres disolventes de extracción utilizados en la macrofita <i>P. australis</i> | 75 |
| Cuadro 7. Comparación entre los tres tratamientos de crecimiento en <i>P. australis</i> , con respecto al solvente utilizado para determinar su eficiencia en la obtención de FT..... | 76 |
| Cuadro 8. Registro de la concentración media de FT en los exudados de <i>P. australis</i> | 77 |
| Cuadro 9. Análisis comparativo entre el efecto de cada uno de los dos métodos de extracción de FT (Row Factor) a partir de los exudados con la condición de crecimiento a la que fue sometido <i>P. australis</i> | 77 |
| Cuadro 10. Cinética de asimilación de nitratos y fosfatos en <i>P. australis</i> | 79 |
| Cuadro 11. Evaluación del efecto alelopático de los extractos acuosos de las estructuras vegetales de <i>P. australis</i> sobre la densidad celular de <i>M. aeruginosa</i> y <i>T. obliquus</i> | 81 |
| Cuadro 12. Perfil químico de <i>Phragmites</i> , muestras analizadas por SPME-GC-MS a partir de biomasa fresca de las estructuras vegetales de hoja..... | 83 |
| Cuadro 13. Perfil químico de <i>Phragmites</i> , muestras analizadas por SPME-GC-MS a partir de biomasa fresca de las estructuras vegetales de tallo..... | 85 |
| Cuadro 14. Especies del fitoplancton encontradas en el embalse Valle de Bravo durante el período de octubre de 2016 a septiembre de 2018..... | 90 |

RESUMEN

Hoy día la mayoría de los cuerpos de agua presentan una condición eutrófica muy severa, por lo que la ocurrencia de floraciones algales es constante. La composición de tales floraciones incluye especies no productoras de toxina como son las algas clorofitas y aquellas capaces de producirlas, como en el caso de algunas cianobacterias. Otro grupo de organismos presentes en los sistemas acuáticos son las macrofitas, cuyo papel es importante debido a que son empleadas como un método biológico en la restauración de sistemas acuáticos, asimismo su presencia se ha relacionado con la disminución de algas y cianobacterias. Por lo que en esta investigación se determinó el potencial alelopático de *Phragmites australis* sobre especies del fitoplancton. Esta macrofita fue evaluada bajo condiciones de crecimiento en laboratorio (PhgL) y bajo condiciones de crecimiento ambiental (PhgA) sobre un modelo de isla flotante (IFM) en el embalse de Valle de Bravo (VB). En ambas condiciones el contenido de fenoles totales (FT) en hoja, tallo, rizoma y exudados se cuantificó como posibles responsables del efecto alelopático. Asimismo, a través de la obtención de extractos metanólicos se determinó la presencia de seis fenoles (ácido cumárico, ácido gálico, ácido catequínico, ácido benzoico, ácido ferúlico y ácido vanílico) mediante análisis cromatográficos en capa fina. Para PhgL el efecto alelopático fue evaluado sobre la cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa* y el alga *Tetradesmus obliquus*. Para PhgA se evaluó sobre la comunidad del fitoplancton presentes en el embalse y en particular sobre cinco especies de cianobacterias tóxicas (*Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii*, *Pseudanabaena mucicola*, *Dolichospermum planctonicum* y *Aphanizomenon yezoense*). Se realizó un monitoreo de variables fisicoquímicas del agua y variables biológicas asociadas a la presencia de cianobacterias en dos ciclos anuales (C-I y C-II) en temporada de secas (DS) y lluvias (RS). Los resultados mostraron en PhgA mayor

potencial de alelopatía debido al contenido de FT (donde la hoja fue la estructura vegetal con la mayor concentración) en comparación con PhgL. El efecto alelopático de PhgL, mostró que *M. aeruginosa* fue menos sensible a la exposición de los extractos (inhibición de 22% - 24% a 10 mg y 17% - 24% a 20 mg, en el día 2 y 4 del ensayo, respectivamente) que *T. obliquus* (con inhibición promedio de 55%, bajo estas concentraciones y días evaluados). Sin embargo, se sugiere que este efecto no fue primordialmente atribuido a los fenoles, ya que su distribución en *Phragmites* no mostró diferencia entre el contenido de FT y el efecto de inhibición. De los seis fenoles propuestos como compuestos alelopáticos presentes en *Phragmites*, únicamente se encontró el ácido benzoico como compuesto volátil mediante microextracción en fase sólida y análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (SPME-GC-MS) en muestras frescas de hoja y tallo. En cambio, en los extractos metanólicos estos fenoles no se detectaron. Por otra parte para PhgA, las variables fisicoquímicas del agua mostraron un incremento de los NO_3^- , mientras que no se observó efecto sobre los PO_4^{3-} . No se presentaron variaciones de los diferentes grupos taxonómicos de fitoplancton, por lo que el grupo de cianobacterias no disminuyó. Sin embargo, la concentración de microcistina extracelular fue menor durante RS en C-II, mientras que la toxina intracelular lo fue en temporada de secas de C-II. Se determinó que en presencia de PhgA hubo un incremento de la cianobacteria *M. aeruginosa*, a la vez que disminuyó la densidad celular de *D. planctonicum*. La presencia de PhgA mostró variación de los factores ambientales como el NO_3^- , el cual estuvo asociado a la cianobacteria *A. yezoense*. Así mismo PhgA tuvo efecto con la temperatura que mostró asociación con *M. aeruginosa*. Los PO_4^{3-} tuvieron correlación con las otras tres cianobacterias restantes. Se observó en los resultados ambientales que en presencia de *Phragmites* hubo por un lado una relación mutuamente excluyente entre *M. aeruginosa* y *A. yezoense* y por otro entre *D. planctonicum* y *P. mucicola*.

ABSTRACT

Nowadays most of the water bodies present a severe eutrophic condition, therefore algal blooms occurrence is constant. These blooms composition includes non-toxin-producing species such as chlorophyta algae, and those capable of producing them, as in the case of some cyanobacteria. Other organisms group in aquatic systems are the group macrophytes, whose role is important because they are used as a biological method in restoration of aquatic systems, and they have been related to the reduction of algae and cyanobacteria. Therefore in this research the allelopathic potential of *Phragmites australis* on phytoplankton species was determined. This macrophyte was evaluated under laboratory growth conditions (PhgL) and under environmental growth conditions (PhgA) on a floating island model (FIM) in the Valle de Bravo reservoir (VB). In both conditions, the total phenols (TF) content in leaf, stem, rhizome and exudate was quantified as possible responsible for the allelopathic effect. Likewise through obtaining methanolic extracts the presence of six phenols (coumaric acid, gallic acid, catechinic acid, benzoic acid, ferulic acid and vanillic acid) was determined by thin-layer chromatographic analysis. For PhgL, the allelopathic effect was evaluated on the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* and the algae *Tetrademus obliquus*. For PhgA the allelopathy on the phytoplankton community in VB and particularly on five species of toxic cyanobacteria (*Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii*, *Pseudanabaena mucicola*, *Dolichospermum planctonicum* and *Aphanizomenon yezoense*) was evaluated. Physicochemical variables of water and biological variables associated with the presence of cyanobacteria were monitored in two annual cycles (C-I and C-II) in dry (DS) and rainy (RS) season. The results showed in PhgA greater potential for allelopathy because to the content of TF (leaf was plant structure with the highest concentration) compared to PhgL. The allelopathic effect of PhgL showed

M. aeruginosa was less sensitive to exposure of the extracts (inhibition of 22% - 24% at 10 mg and 17% - 24% at 20 mg, on day 2 and 4 of the trial) than *T. obliquus* (with mean inhibition of 55 %, under these concentrations and days evaluated). However it is suggested this effect was not primarily attributed to phenols, because their distribution in *Phragmites* showed no difference between TF content and inhibition effect. Of the six phenols proposed as allelopathic compounds present in *Phragmites*, only the benzoic acid was found as a volatile compound by Solid Phase Microextraction - Gas Chromatography - Mass Spectrometry (SPME-GC-MS) in fresh leaf and stem samples. In contrast in the methanolic extracts these phenols were not detected. On the other hand for PhgA, the physicochemical variables of water showed an increase in NO_3^- , while no effect was observed on PO_4^{3-} . There were no variations of the different taxonomic groups of phytoplankton, therefore cyanobacteria group did not decrease. However, the extracellular microcystin concentration was lower during RS in C-II, while intracellular toxin was lower in dry season of C-II. In presence of PhgA there was an increase of *M. aeruginosa*, while the cell density of *D. planctonicum* decreased. Also PhgA showed variation in environmental factors such as NO_3^- , which was associated with cyanobacterium *A. yezoense*. Likewise PhgA had effect on temperature that showed association with *M. aeruginosa*. The PO_4^{3-} were correlated with the other three remaining cyanobacteria. It was observed in the environmental results that in the presence of *Phragmites* there was on the one hand a mutually exclusive relationship between *M. aeruginosa* and *A. yezoense* and on the other between *D. planctonicum* and *P. mucicola*.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy día la mayoría de los cuerpos de agua presentan una condición eutrófica muy severa, por lo que la ocurrencia de floraciones algales es constante. La composición de tales floraciones incluye especies no productoras de toxina como son las algas clorofitas y aquellos grupos de cianobacterias capaces de producirlas. Este último grupo del fitoplancton produce metabolitos secundarios, los cuales no solo afectan la calidad del agua sino también son perjudiciales para otras poblaciones del fitoplancton, del zooplancton, invertebrados, peces y mamíferos, alterando los procesos de desarrollo y reproducción (Paerl y Huisman 2009; Schindler et al., 2016).

Otro grupo de organismos presentes en los sistemas acuáticos son las macrofitas, cuyo papel es importante y conocido por su relación con la sedimentación de sólidos que promueve la transparencia del agua. Además, su presencia se ha relacionado con la disminución de algas y cianobacterias. Esto se ha confirmado mediante estudios *in vivo* o *in vitro* enfocados primordialmente en dilucidar como las macrofitas y sus compuestos activos ejercen efecto alelopático sobre las especies del fitoplancton (Zhu et al., 2020; Wang et al., 2015; Nandini et al., 2019). La producción y liberación de aleloquímicos permite que las macrofitas sean consideradas como un método de control biológico al inhibir las floraciones algales dañinas presentes en los cuerpos de agua eutrofizados (Borne et al., 2013; Wang et al. 2015).

Algunos de los compuestos alelopáticos que producen las macrofitas son principalmente terpenos, ácidos grasos, flavonoides y ácidos fenólicos. Estos últimos, se presentan con mayor abundancia en las macrofitas, que al ser moléculas de menor tamaño requieren de un

bajo gasto energético para ser producido por la planta y han mostrado una mejor capacidad de dispersión en el ambiente acuático, lo que le permitiría actuar de forma más directa sobre las cianobacterias a diferencia de los otros compuestos (Chou, 1999; Březinová y Vymazal, 2018; Tazart et al. 2019).

Entre las macrofitas más estudiadas con capacidad para rehabilitar la calidad del agua se encuentra *Phragmites australis*, la cual ha sido aprovechada en humedales artificiales de flujo subsuperficial para el tratamiento de aguas de desecho doméstico y agrícola, dada su capacidad de remoción de nutrientes y resistencia a ambientes contaminados (Nakai et al. 2010; Cao et al. 2008). Sin embargo, hay escasa información de *Phragmites* sobre la contribución de estas características y su potencial alelopático al disminuir la densidad celular de algas, particularmente de cianobacterias tóxicas, en la rehabilitación de grandes cuerpos de agua eutrofizados (Li y Hu 2005; Zhou et al. 2006; Uddin et al. 2012, 2017). Asimismo, se han realizado estudios sobre la presencia y contribución de ciertas sustancias aleloquímicas que participan en este proceso, de las cuales los fenoles han tomado relevancia como agentes alelopáticos presentes en otras macrofitas (Smolders et al. 2000; Körner y Nicklisch 2002; Erhard y Gross 2006; Nakai et al. 2012; Wu et al. 2013), pero se desconoce la contribución de *Phragmites* a este efecto. Esto conlleva a comparar los resultados de su capacidad alelopática determinada en laboratorio, con los registros en la naturaleza. Por tanto, el estudio de la influencia de los factores ambientales, que si bien por una parte promueven la presencia de floraciones de cianobacterias y por otra, activan los mecanismos alelopáticos en *Phragmites*, podrían explicar la entramada relación ecológica entre ambos grupos, y cómo la macrofita lograría reducir la proliferación algal en cuerpos de agua eutrofizados.

2. ANTECEDENTES

2.1. El concepto de “alelopatía”

La alelopatía es un proceso en el que las relaciones entre organismos involucran la producción y liberación de metabolitos secundarios que participan en la capacidad de obtención de recursos como espacio, radiación luminosa, agua o nutrientes. El concepto de alelopatía se deriva de las raíces griegas *allelon* = recíproco y *pathos* = sufrimiento, es decir, el efecto perjudicial entre dos organismos. Desde 1937, Molisch se refiere al proceso por el cual una planta influye sobre otra a través de compuestos químicos; en 1984 Rice incluye en la definición a microorganismos tales como bacterias, hongos y microalgas. Este autor considera la alelopatía como un proceso cuyos efectos pueden ser negativos o positivos sobre las especies susceptibles a tales compuestos. Durante el Primer Congreso Mundial de Alelopatía (International Allelopathy Society, 1996), se estableció que la alelopatía se refiere a “cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, que influyan sobre el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos”. En sentido estricto el efecto de la alelopatía sobre un organismo involucra la liberación de compuestos químicos al hábitat que comparte con otros. Sin embargo, en ambientes naturales la alelopatía suele confundirse con la competencia, la cual se refiere a la disminución de factores como depredación, alimento, espacio, luz y nutrientes en el medio y que también requiere otro organismo con el que comparte el hábitat (Rizvi y Rizvi, 1992). Si bien, ambos procesos pueden tener lugar en un mismo ambiente, el estudio de las relaciones biológicas resulta más complicado. Para discernir claramente entre los dos conceptos Müller propuso el término “interferencia” a fin de

explicar la influencia total de una planta sobre otra que puede darse tanto por alelopatía como por competencia (Müller, 1969, 1970; Rice, 1984). Así, el estudio y aplicación de la interferencia puede contribuir al entendimiento sobre el papel de las interacciones vegetales y microbianas, al probar que la alelopatía es un mecanismo más que influye en la dinámica de dichas comunidades, ya sean terrestres o acuáticas junto con la competencia (Anaya, 2003; Wardle et al., 2011). Por lo tanto, con base en la evidencia de los estudios en los sistemas naturales y experimentales, cuando dos organismos interactúan, uno de ellos puede impedir el crecimiento del otro por uno o ambos procesos. Con la identificación de los compuestos alelopáticos, su modo de acción y el efecto sobre la especie receptora, la alelopatía es una forma de competencia por interferencia (Gross et al., 2012). La competencia entre organismos se determina por la explotación de uno o más recursos e implica una relación tanto intra como interespecífica. La competencia por interferencia alelopática se refiere a una acción antagonista, que implica la producción y liberación de sustancias bioactivas inhibitorias con efecto sobre otras especies. Es decir, la presencia de una interferencia química puede reestructurar la función de la comunidad. Con las primeras definiciones de alelopatía, los estudios en este proceso se enfocaron en plantas, donde los compuestos con actividad alelopática se identificaron como metabolitos secundarios liberados al aire a través de la volatilización, o bien directamente al suelo por lixiviación, descomposición de los residuos vegetales y exudación de las raíces (Bhadoria, 2011). Entre los compuestos más comunes se encuentran fenoles, flavonoides, alcaloides, terpenos y glucósidos cianogénicos, por lo que a través de estos las plantas pueden controlar el ambiente en el que habitan, (Cutler y Cutler, 1999) y además ocasionan un cambio en la sucesión de las especies (Gopal y Goel, 1993).

Las sustancias alelopáticas pueden ser producidas y liberadas en cualquier parte de las plantas, estos compuestos al ser tóxicos para otros organismos pueden inhibir el brote, crecimiento de raíces, absorción de nutrientes, incluso el efecto puede alterar sus procesos fisiológicos y metabólicos. Las raíces y hojas suelen ser la parte de la planta más importante en la producción de sustancias químicas y que además están fuertemente asociadas con los microorganismos del agua y el suelo (Duke, 2003; Morris et al., 2009). En ambientes terrestres, durante la descomposición microbiana y degradación enzimática de la biomasa vegetal muerta, se libera una gran variedad de sustancias químicas al suelo con potencial de inhibir la germinación de semillas y el crecimiento de otras plantas (Patrick, 1971; Chen et al., 2017; Latif et al., 2017). Algunos de estos compuestos que provienen de la misma biomasa vegetal son transformados químicamente por los microorganismos a aleloquímicos, como son: ácidos grasos de cadena corta, ácidos fenólicos o alcaloides (Chou, 1999; Scavo et al., 2018; Schandry y Becker, 2020). Es así como la actividad de los aleloquímicos en el suelo depende de las interacciones entre las plantas y los microorganismos, pues estas sustancias pueden ser neutralizadas, reducidas o incrementar el efecto alelopático de una planta hacia otra (Williamson y Weidenhamer, 1990; Mohamed, 2017; Tan et al., 2019). Los organismos microbianos no son capaces de disponer totalmente de los nutrientes, pues no los almacenan como las plantas. Así, la importancia ecológica de los compuestos aleloquímicos producidos por las bacterias puede afectar las raíces de las plantas, aún cuando se trata de una relación de coevolución (Mallik, 2002; Polyak y Sukcharevich, 2019; Schandry y Becker, 2020). En esta coexistencia entre plantas y microorganismos, cualquier especie capaz de liberar sustancias con actividad alelopática desarrolló mecanismos biológicos a la presencia de aleloquímicos producidos a partir de la degradación microbiana. Sin embargo, en el suelo los aleloquímicos pueden ser

absorbidos por algunas partículas del sustrato, lo que restringe su movilidad y afecta de manera negativa la concentración de las sustancias. La retención de su actividad alelopática es un aspecto crucial en la interacción de estos compuestos. Ya que estas moléculas también pueden sufrir transformaciones, llegar a ser más activas, disminuir su efectividad e incluso cambiar a compuestos inactivos por completo (Inderjit, 1996; Grutters et al., 2017; Blum, 2019).

2.2 Alelopatía en sistemas acuáticos

El estudio de la alelopatía en los sistemas acuáticos incluye a casi todos los organismos fotosintéticos como potencialmente productores de compuestos alelopáticos (Erhard, 2006; Farooq et al., 2020), sin embargo, las plantas asociadas a cuerpos de agua como las macrofitas han sido las más constantes en investigaciones alelopáticas en este medio. Las macrofitas liberan sus compuestos alelopáticos principalmente a través de mecanismos celulares que incluyen transportadores específicos (Figura 1). Las macrofitas al ser organismos fotoautótrofos utilizan la radiación luminosa en parte a la síntesis los aleloquímicos que son liberados al ambiente circundante (Gross, 2003; Erhard, 2006; Macías, et al., 2008). En el agua las sustancias químicas se transmiten por flujo laminar con un movimiento suave y pasivo y, al ser compuestos de bajo peso molecular se mueven con mayor facilidad entre el líquido (Wolfe, 2000; Farooq et al., 2020). Los aleloquímicos identificados en estos organismos incluyen compuestos de sulfuro, derivados de ácidos grasos, poliacetilenos, ácidos fenólicos y polifenoles (Legrand et. al. 2003; Schandry y Becker, 2020). El criterio que se considera para la acción de estos compuestos es la distancia entre organismos productores y receptores de aleloquímicos, pues esto es un

factor a considerar en el medio acuático. La dilución de estas sustancias en el agua afecta de manera directa el efecto de los aleloquímicos, ya que, al viajar a través del agua, las sustancias con propiedades hidrofílicas pueden alcanzar a las células receptoras, a diferencia de las sustancias lipofílicas presentes comúnmente en organismos que habitan los sistemas terrestres (Erhard, 2006; Macías et al., 2008).

Al considerar estas características, Lewis (1986) menciona que la alelopatía puede no ser una estrategia estable de evolución cuando se presenta entre planta-microorganismo, dada las distancias filogenéticas entre ellos, el gran número de otros individuos en el ambiente y las propiedades químicas de las moléculas involucradas. Las plantas productoras de aleloquímicos podrían no beneficiarse directamente de sus propios metabolitos, sino que los aprovecharían otros organismos fotosintéticos presentes en el sistema. En este sentido, las especies no productoras podrían evitar los costos asociados a las sustancias alelopáticas, al mismo tiempo que obtendrían todos los beneficios de las especies productoras. Así, Lewis (1986) para aclarar el concepto de alelopatía en sistemas acuáticos, propuso “la hipótesis de la señal aleloquímica”, la cual explica que la sustancia alelopática que produce un organismo es solo un metabolito secundario más, pero que en la especie receptora esta sustancia puede afectar tanto su desarrollo como su ciclo de vida. Actualmente, esta teoría ha perdido vigencia, debido a los estudios en mecánica de fluidos, donde se sabe que el medio acuoso alrededor de las especies es bastante estable. De este modo, el problema de los beneficios distribuidos se reduce y las ventajas sobre la producción de aleloquímicos vuelven a tomar relevancia (Morris et al., 2009; Wardle et al., 2011). Otro hecho que refuerza el mecanismo actual de la alelopatía es que esas sustancias liberadas por el organismo productor, generalmente no tienen efecto sobre ellos mismos, lo que rechazaría el concepto de autoalelopatía. Las especies productoras tienen un mecanismo de

señalización y autoprotección contra sus propios metabolitos alelopáticos, los cuales son específicos de cada especie. (Gleason y Baxa, 1986; Smith y Doan, 1999; Meiners et al., 2012).

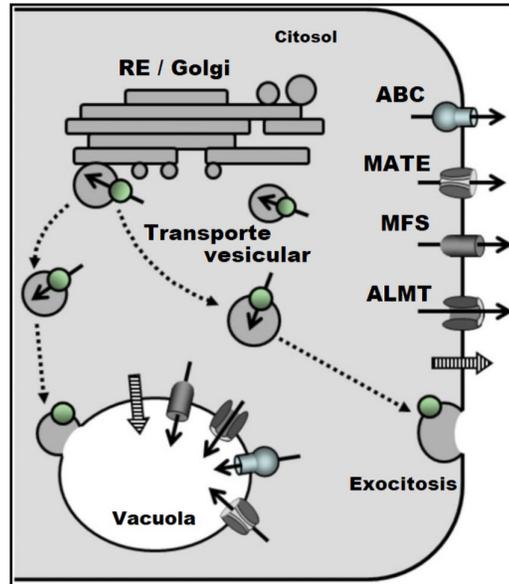


Figura 1. Diagrama de una célula del sistema radicular del género *Phragmites*. Se muestra las vías y proteínas implicadas en el transporte de ciertos metabolitos especializados alrededor del citosol y su exportación a la rizosfera. Las vesículas que brotan del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi pueden cargarse con metabolitos alelopáticos, que se dirigen al tonoplasto o a la membrana plasmática donde se fusionan con estas membranas y liberan su contenido en la vacuola o en el espacio extracelular (exocitosis). El símbolo redondo representa un transportador genérico que carga compuestos en las vesículas. Las proteínas de transporte unidas a la membrana que facilitan el transporte de compuestos a través de las membranas incluyen la familia de casetes de unión a ATP (ABC), la familia de extrusión de compuestos tóxicos y multidrogas (MATE), la superfamilia facilitadora principal (MFS) y la familia de transportador de malato activado por aluminio (ALMT). La flecha rayada indica la posible vía de difusión de compuestos altamente hidrófobos a través de las bicapas lipídicas. Las otras flechas muestran la dirección del movimiento del sustrato (Tomado de Weston et al., 2012).

Los estudios de alelopatía en las macrofitas tienen como objetivo principal aislar e identificar químicamente los compuestos bioactivos producidos por las diferentes especies. Asimismo, evaluar el efecto alelopático de los compuestos en modelos de laboratorio y su posible aplicación en sistemas acuáticos naturales (Gawronska y Golsiz, 2006). En los lagos, el papel de la alelopatía se sugiere como un factor que establece la dinámica de sucesión entre los organismos; particularmente en sistemas acuáticos eutrofizados los

compuestos alelopáticos de las macrofitas pueden contribuir en la inhibición de especies de cianobacterias dañinas formadoras de floraciones (Mulderij et al., 2007; Santonja et al. 2018). En ríos y arroyos las sustancias alelopáticas son rápidamente arrastradas por la corriente, por lo que el impacto de la alelopatía tiene menor importancia en las comunidades del potamoplancton (Legrand et al., 2003; Muhammad y Majeed, 2020). En este tipo de ambientes, las sustancias aleloquímicas tiene propiedades lipofílicas las cuales son transferidas por contacto directo entre los organismos que comparten una matriz. Dentro de esta biopelícula se dan relaciones de competencia por nutrientes, espacio por la zona de anclaje o radiación luminosa, esta competencia por los recursos funciona entonces como una presión selectiva que puede influir en la formación de interacciones alelopáticas (Jüttner, 1999; Leflaive y Ten-Hage, 2009).

Otra característica de los organismos de habitas acuáticos es su mayor permeabilidad, comparada con los individuos de ambientes terrestres. Las plantas que se desarrollan en sistemas acuáticos presentan mecanismos fisiológicos que facilitan la liberación de los compuestos bioactivos; entre estos mecanismos están las hojas, que presentan una reducción o ausencia de estomas, así como una cutícula reducida con espacios entre células, asimismo se facilita la liberación de aleloquímicos por exudación a través de diferentes mecanismos en los compartimentos del sistema radicular (Weston et al., 2012; Santonja et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Las macrofitas productoras de sustancias alelopáticas que habitan en lagos, estanques o lagunas utilizan la alelopatía como mecanismo de competencia contra otras especies por los nutrientes e influir sobre organismos de otros y hasta del mismo género (Dhingra y Ahluwalia, 2007). La alelopatía de las especies en los sistemas acuáticos son sustancias con

una buena distribución mediante la producción y liberación de suficientes aleloquímicos que ejercen su efecto sobre las especies receptoras (Leflaive y Ten-Hage, 2009). Estos compuestos pueden alcanzar el interior de la célula objetivo mediante proteínas especializadas en el transporte activo de sustancias. Las proteínas transmembrana que forman canales se conocen como transportadores ABC (casete de unión a ATP), que son capaces de transportar compuestos polares con un peso molecular >1000 Da (Weston et al., 2012).

Otra vía de ingreso de las sustancias aleloquímicas a la célula receptora es mediante transporte pasivo atravesando las bicapas lipídicas de la membrana. El tipo de sustancias que cruzan la membrana celular deben ser lipofílicas o al menos ser anfipáticas (moléculas con un extremo soluble en agua llamado hidrofílico y otro que rechaza el agua, conocido como hidrofóbico). Se ha observado que los efectos de estos compuestos activos no solo llegan a afectar en algún modo la fotosíntesis, sino incluso el cloroplasto. La naturaleza de estos compuestos activos también forma parte del estudio de la alelopatía, pues trata de ilustrar la estructura y reacción química de las moléculas involucradas y su persistencia activa en el medio (Weston, 1996; Inderjit y Dakshini, 1995; Weidenhamer, 2008). En este sentido, la alelopatía no solo se trata de los compuestos bioactivos que una planta es capaz de producir, sino además del mecanismo de liberación, transporte, almacenamiento, efecto sobre otros organismos y la influencia de los factores ambientales. Por lo que la sola presencia de un competidor no activa los procesos alelopáticos en la especie productora, sino que intervienen criterios como el genotipo, iluminación, temperatura, nutrientes, humedad, altitud y clima, que actúan directamente sobre la cantidad de metabolitos secundarios con actividad alelopática (Rice, 1984; Fischer et al., 1994; Einhellig, 1995; Blum, 2019).

El estrés físico que puede ser causado por la luz ultravioleta, el fotoperiodo y la intensidad luminosa, en tanto el estrés químico es provocado por la presencia de algunos herbicidas, deficiencia de algunos minerales y nutrientes, incluso el estrés biológico como el ataque de patógenos, la herbivoría y la depredación, todos ellos son agentes causales que comúnmente disparan una respuesta hacia el incremento en la cantidad de los compuestos aleloquímicos (Anaya, 2003; Erhard, 2006; Macías et al., 2008). Sin embargo, no siempre la concentración de las sustancias alelopáticas es uniforme aún cuando se contemple la mayoría de los factores que intervienen en el proceso, por lo que este hecho imposibilita cuantificar de manera real los aleloquímicos en su medio, así como su actividad biológica sobre otros organismos. Además, una interferencia por alelopatía no solo está determinada por un compuesto, si bien, puede tratarse de una sinergia entre una o varias clases de metabolitos secundarios (Einhellig, 1995; Leão et. al. 2010; Maberly y Gontero, 2018). Considerar los aspectos antes mencionados ayudará a explicar y entender este multifacético proceso que sucede en los sistemas naturales.

2.3 Alelopatía por macrofitas

El papel de las macrofitas en sistemas acuáticos está relacionado con la disminución en la turbidez del agua debido a la resuspensión del sedimento, proporciona refugio a distintas especies principalmente a las del zooplancton, que al incrementar su biomasa actúan como depredadores del fitoplancton y contribuyen a la estabilización de agua clara y rehabilitación en lagunas, estanques y lagos eutróficos (Gross, 2003; Erhard, 2006; Macías et al., 2008; Wang et al., 2015). Las macrofitas son organismos eficaces en la adquisición de nutrientes como nitrato, amonio, fósforo en su forma química de fosfatos y carbono

inorgánico disuelto que se encuentran en agua o sedimento (Horppila y Nurminen, 2001). Estas características en el consumo de nutrientes, las hace competidoras directas con las algas. En cuerpos de agua eutrofizados las macrofitas pueden funcionar como un método de control biológico de las floraciones de cianobacterias; esta alta densidad provoca diversos efectos negativos en la calidad del agua (Pflugmacher et al., 2001; Mowe et al., 2019). Dentro del grupo de cianobacterias hay especies que son capaces de producir microcistinas, por lo que está presente el riesgo de que el manejo y uso del recurso hídrico contenga estas toxinas. La presencia de microcistinas en los ecosistemas acuáticos también modifica la sucesión entre las especies (Bakker et al., 2010; Pham y Utsumi, 2018; Pham et al., 2020).

Los aleloquímicos liberados por las macrofitas pueden presentar un efecto de inhibición de las poblaciones de cianobacterias. Entre los estudios sobre la producción y liberación de alelopáticos por las macrofitas, el estrés por factores abióticos como la deficiencia de nutrientes, incremento de la temperatura y disminución de la irradiación luminosa, han demostrado incrementar la cantidad de aleloquímicos. Los factores bióticos como la herbívora intensa y la competencia han mostrado tener resultados similares en la producción de las sustancias bioactivas (Lemoine et al., 2009; Grutters et al., 2017; Blum, 2019).

Los aleloquímicos producidos por las macrofitas actúan deteriorando el proceso celular en el crecimiento de las cianobacterias. Estas sustancias activas inducen una alta tasa de fotosíntesis, reduciendo el dióxido de carbono, lo que incrementa el nivel del pH en el agua. El incremento del pH interfiere con los procesos metabólicos y reduce la capacidad de absorción de nutrientes por parte de algas y cianobacterias (Körner y Nicklisch, 2002; Addisie y Medellin, 2012) y entre otros procesos afectados están la división celular, la

diferenciación celular, respiración, fotosíntesis, función enzimática y señalización de la transducción en la expresión genética (Duke, 2003; Legrand et al., 2003; Hu y Hong, 2008).

En sistemas acuáticos el estudio de la alelopatía requiere conocer aquellas especies susceptibles o potencialmente sensibles a las sustancias bioactivas liberadas por las macrofitas. Los bioensayos con macrofitas de distintos hábitats suelen considerar especies de macrofitas emergentes, flotantes y sumergibles. Los aleloquímicos de estas plantas provienen de las hojas y tallos o a partir de exudados liberados por la raíz. Estos estudios permiten comparar la respuesta de las especies del fitoplancton a las sustancias alelopáticas específicas de una macrofita. La respuesta alelopática individual de cada especie puede verse modificada por condiciones limitantes y no limitantes de nutrientes como nitrógeno y fósforo o diferentes condiciones de luz (Gross et al., 2012, Hilt y Gross, 2008).

Por otra parte, algunos de los aleloquímicos de las macrofitas son obtenidos en mesocosmos a partir de condiciones que imitan al medio natural, donde se eliminan interferencias ambientales y se controlan las variables del diseño experimental (Švanys et al., 2014; Gette-Bouvarot et al., 2015). Los resultados de este tipo de bioensayos proveen de información sobre el papel de las macrofitas en la estructura de la comunidad natural, ya que organismos pertenecientes a la misma especie pueden presentar o no, la capacidad de producir sustancias alelopáticas y de acuerdo a las condiciones ambientales de crecimiento. En este último caso, estos compuestos pueden afectar el desarrollo de un competidor, provocando una disminución en su consumo de nutrientes. De este modo, la especie productora tiene acceso a una mayor disponibilidad de este recurso, por lo que su biomasa

es progresivamente mayor al del competidor (Reigosa et al., 1999; Gawronska y Golisz, 2006).

2.4 Escenario del efecto alelopático de macrofitas sobre especies del fitoplancton

En un ambiente acuático oligotrófico o mesotrófico, las macrofitas presentan una mayor eficiencia en el consumo de nutrientes como nitrógeno y fósforo debido a la poca densidad celular que presentan las especies del fitoplancton. Sin embargo, en sistemas eutróficos o hipertróficos, las macrofitas entran en competencia por los nutrientes con las especies del fitoplancton, cuya tasa de crecimiento y reproducción incrementa su velocidad de consumo. Esto significa que la capacidad de las macrofitas de reducir o controlar el crecimiento de las poblaciones de cianobacterias puede no suceder por efecto de la competencia sino por la acción o efecto de las sustancias alelopáticas (Aslan y Kapdan, 2006; Nakai et al., 2006).

Entre los compuestos químicos reportados en macrofitas como alelopáticos están los fenoles y terpenos (Choi et al., 2009; Salomon et al., 2013). Esta actividad principalmente ha sido evaluada sobre cianobacterias; sin embargo, en clorofitas se conoce poco cuáles son las especies susceptibles a los compuestos bioactivos de las macrofitas. Esto se debe a que las altas densidades de microalgas no representan un riesgo de salud pública, a diferencia de las cianobacterias que producen toxinas. A pesar de esto, es importante conocer el impacto ecológico de las sustancias bioactivas de las macrofitas en otros niveles taxonómicos (Chang et al., 2012).

2.5 Efecto de los factores ambientales en la respuesta alelopática

El estudio de los factores ambientales sobre las especies productoras de sustancias alelopáticas es entender la compleja interacción con las especies receptoras en los sistemas naturales, ya que la variación de factores bióticos y abióticos genera un estrés que ocasiona una alteración en el desarrollo de los organismos (Moran y Alexander, 2014; Sukenik et al., 2015). En las macrofitas, una limitación de los factores ambientales puede causar un decremento en el crecimiento, disminución de la actividad fotosintética y de la respiración, que reduce la capacidad de producción de energía en forma de ATP y afecta de manera negativa su viabilidad. Sin embargo, esta condición limitante podría ser una presión fisiológica para diversas estrategias y acceder a los nutrientes, contrarrestando la deficiencia de los recursos y aumentando la efectividad en la competencia con otras especies (Figura 2). Uno de estos mecanismos de adaptación a las condiciones limitantes puede ser la generación de sustancias alelopáticas (Plaxton, 2004). Por ejemplo, en condiciones limitantes de fósforo, las macrofitas desarrollan distintas adaptaciones bioquímicas como son: i) activación de múltiples transportadores con alta afinidad al fósforo, ii) acumulación de fósforo en la forma de polifosfatos y fosfolípidos, iii) inducción de enzimas que reciclan fuentes de fósforo en el interior de la célula, iv) inducción de síntesis y excreción de ácidos orgánicos u otro tipo de moléculas asociadas al metabolismo secundario. Esta última adaptación se comporta como un mecanismo de señalización en la producción y liberación de sustancias alelopáticas (Kong et al., 2018; Lyytinen y Lindström, 2019).

Una vez sintetizados estos compuestos son transportados mediante canales transmembranales tipo ABC especializados en el transporte activo (ATP binding cassette) de sustancias a través de la membrana celular; otro tipo de transportadores que pertenecen a la familia malato-aluminio activado (ALMT); exocitosis mediados por vesículas; por la vía de extrusión a múltiples fármacos y compuestos tóxicos (MATE) o por una denominada superfamilia facilitadora (MFS), todos estos procesos de transporte van desde el interior de la célula a hojas, tallo o raíces y de ahí hacia el exterior (Plaxton y Tran, 2011; Weston et al., 2012; Grossman y Aksoy, 2015).

Bajo condiciones deficientes de nitrógeno se puede inducir la expresión de genes asociados al metabolismo secundario que codifican para precursores intermediarios como: i) la fenilalanina amonio-liasa (PAL), enzima que cataliza la reacción que convierte la fenilalanina en amonio y da origen a los compuestos fenólicos, cuya actividad ha sido reportada como alelopática. Entre algunos fenoles con estas características se encuentran el ácido cinámico, el ácido gálico y el ácido salicílico, entre otros. Por lo tanto, cuando el nitrógeno es limitante la actividad de la PAL puede aumentar y con ello el contenido fenólico, ya que la planta pausa la síntesis de proteínas requeridas para el crecimiento y prioriza la síntesis de fenoles (Razal et al., 1996; Scheible et al., 2004).

Otro compuesto que interviene en la síntesis de fenoles es la fenilalanina, primer precursor en la ruta de fenilpropanoides implicado en la biosíntesis de compuestos polifenólicos como flavonoides, ii) la O-metiltransferasa que constituye una familia de enzimas que metila los átomos de oxígeno de estos flavonoides y fenilpropanoides y iii) el citocromo P450, el cual está involucrado en la síntesis *de novo* de compuestos fenólicos como el ácido cumárico, el cual también participa en el proceso de desintoxicación (Lam et al., 2007;

Song et al., 2008). Con base en lo anterior, tanto las condiciones limitantes de nitrógeno y/o fósforo pueden activar los mecanismos de señalización, los cuales consisten en suspender la síntesis de proteínas y activar la producción de metabolitos secundarios como los fenoles (Rejmánková, 2016). Este tipo de estudios aportan valiosa información sobre los mecanismos asociados a la producción de alelopáticos en las macrofitas emergentes.

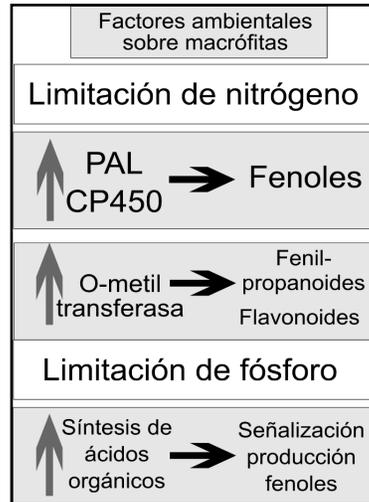


Figura 2. Mecanismos celulares involucrados en la respuesta alelopática en células de macrofitas bajo condiciones de limitación de nitrógeno y fósforo. Las flechas en vertical indican la intensidad en la activación del metabolismo a la condición limitante. Las flechas en dirección horizontal es la respuesta en el metabolismo asociado a la producción y liberación de metabolitos secundarios con actividad alelopática (Diagrama con base en Lam et al., 2007; Song et al., 2008).

2.6 Metabolitos secundarios con actividad alelopática en macrofitas

La evidencia sobre la capacidad de excretar compuestos orgánicos con efecto alelopático por las macrofitas, algunas veces en cantidades considerables ha sido documentada desde los años setentas y ochentas (Hootsmans y Blindow, 1994; Santonja et. al. 2018). Además, durante esta última década se reportó que estos compuestos orgánicos también pueden estar presentes en los distintos tipos de tejidos de las macrofitas (Wium-Andersen, 1987; Puche

et. al. 2020). Sin embargo, desde finales de la década de los 40's se conoce que las macrofitas pueden tener un efecto de inhibición en el crecimiento del fitoplancton (Hasler y Jones, 1949). Esos resultados provienen de la implementación de humedales artificiales con macrofitas y su capacidad de disminuir las poblaciones del fitoplancton bajo condiciones ambientales. Con base en estos hallazgos, actualmente el proceso de alelopatía considera los metabolitos secundarios que producen las macrofitas como aquellas sustancias que al ser liberadas al medio pueden presentar un efecto alelopático (Mohamed, 2017; Lyytinen y Lindström, 2019).

Los estudios de alelopatía en macrofitas se han realizado en distintas especies que pertenecen a tres grupos que se dividen de acuerdo con su desarrollo en el ambiente acuático: emergentes, flotantes y sumergidas (estas investigaciones y sus resultados se detallan en la sección de antecedentes). Todas las especies de macrofitas son potencialmente capaces de producir compuestos orgánicos que pertenecen a grupos químicos como: ácidos fenólicos, polifenoles, flavonoides, terpenos, ácidos orgánicos y ácidos grasos, a los que se le atribuye el efecto de inhibición sobre el fitoplancton (Nakai et al., 1999, 2012; Men et al., 2007; Chang et al., 2012; Wang et al., 2015).

En particular, las macrofitas emergentes pueden producir una mayor cantidad de compuestos bioactivos debido a su mayor tamaño y biomasa en comparación a los otros dos tipos. Sin embargo, en este proceso también interviene la respuesta fenotípica de cada especie a las condiciones ambientales como la temperatura, luz y disponibilidad de nutrientes (Cronin et al., 2003; Rejmánková, 2016). Su capacidad para asimilar el nitrógeno y fósforo depende de la disponibilidad de estos recursos los cuales se asocian directamente al desarrollo de la macrofita. Es decir, si la concentración de estos nutrientes es limitante, la

planta responde con un decremento en el tamaño del tallo, hojas y sistema radicular, y cuando hay una alta disponibilidad de nutrientes, la planta desarrolla un óptimo crecimiento. De esta forma, en sistemas acuáticos eutróficos donde las concentraciones de nutrientes son altas, los modelos con macrofitas emergentes resultan una alternativa eficiente en la remoción de nutrientes y control algal (Cronin y Lodge, 2003; Grutters et al., 2017). En este último aspecto, las especies de macrofitas emergentes han tomado gran relevancia debido a los compuestos alelopáticos producidos que son evaluados sobre cianobacterias y algas (Cuadro 1).

Por otra parte, con base en las diferencias morfológicas y de hábitats entre las especies de macrofitas, se puede tener una aproximación con respecto a la producción de los compuestos fenólicos como agentes alelopáticos (Cao et al., 2008; Choi et al., 2009; Rejmánková, 2016; Harrison et al., 2017; Březinová y Vymazal, 2018).

En el caso de las macrofitas flotantes, estas plantas presentan hojas que flotan principalmente en la superficie del agua mientras que las raíces están ancladas en el sustrato. Gran parte del cuerpo de la macrofita está bajo el agua y puede estar o no enraizado en el sustrato y únicamente pequeñas porciones como las flores se elevan por encima del nivel del agua. Los tallos conectan las hojas, que son circulares u ovaladas y tienen una textura dura y coriácea en la parte inferior. Las macrofitas flotantes tienen adaptaciones estructurales que les impiden hundirse en el agua y que, al mantenerse a flote, pueden absorber al máximo la luz solar e intercambiar fácilmente gases con la atmósfera. Estas macrofitas pueden dar mucha sombra por debajo del agua, reduciendo la cantidad de especies sumergidas que compiten con ellas por los nutrientes (Rejmánková, 2011; Addisie y Medellín, 2012).

Cuadro 1. Macrofitas emergentes con efecto alelopático sobre organismos del fitoplancton.

| Macrofita emergente | Especie fitoplancton sensible | Referencia |
|---|--|---|
| <i>Arundo donax</i> | <i>Microcystis aeruginosa</i> | Chen et al., 2011; Wang, et al., 2011. |
| <i>Eleocharis microcarpa</i> | <i>Haematococcus lacustris</i> <i>Dolichospermum flos-aquae</i> <i>Oscillatoria tenuis</i> | Proctor, 1957, van Aller et al., 1985. |
| <i>Phragmites communis</i> <i>Phragmites australis</i> | <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Auxenochlorella pyrenoidosa</i> <i>Phormidium sp.</i> <i>Tetrademus obliquus</i> <i>Monoraphidium capricornutum</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | Li y Hu, 2005, Zhou et al., 2006, Men et al., 2007. |
| <i>Berula erecta</i> | <i>Nitzschia palea</i> | Wium-Andersen, 1987. |
| <i>Acorus tatarinowii</i> | Cianobacterias, clorofitas | Greca et al., 1989. |
| <i>Acorus calamus</i> | Cianobacterias, clorofitas | |
| <i>Zantedeschia aethiopica</i> <i>Juncus effuses</i> <i>Juncus acutus</i> | <i>Monoraphidium capricornutum</i> | Greca et al., 1998, 1996, 2001. |
| <i>Typha sp.</i> | <i>Dolichospermum flos-aquae</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Auxenochlorella pyrenoidosa</i> <i>Tetrademus obliquus</i> | Gallardo et al., 1998; Men et al., 2007. |
| <i>Typha Angustifolia</i> | Cianobacterias | Zhang et al., 2012. |
| <i>Cyperus alternifolius</i> | <i>Microcystis aeruginosa</i> | Nakai et al, 2008. |

En cuanto a las macrofitas sumergidas pasan todo su ciclo de vida debajo de la superficie del agua y casi todas tienen sus raíces en el sustrato. Estas macrofitas pueden absorber oxígeno disuelto y dióxido de carbono directamente de la columna de agua. Asimismo, las especies de este grupo presentan el mayor número de adaptaciones a la vida en el agua. Tienen poco o ningún tejido de fortalecimiento mecánico en los tallos y los pecíolos de las hojas, por lo tanto, cuando estas plantas se retiran del agua, cuelgan. Las macrofitas sumergidas carecen de los tejidos protectores externos y todas las células de la superficie parecen ser capaces de absorber agua, nutrientes y gases disueltos del agua circundante. Las raíces pueden absorber fácilmente nutrientes y su función principal es el anclaje. Las hojas suelen estar diseccionadas o divididas, lo que les confiere una ventaja adaptativa en la absorción de nutrientes y llevar a cabo la fotosíntesis (Milke et al., 2020; Ren et al., 2020).

Con respecto a las macrofitas emergentes, estas tienen sus raíces en un suelo con porciones basales que normalmente crecen debajo de la superficie del agua, pero cuyas hojas, tallos (partes fotosintéticas) y órganos reproductores son aéreos. Estas macrofitas desarrollan estructuras celulares con espacios entre las células capaces de recolectar dióxido de carbono, que se mueve a las raíces donde se combina con otros nutrientes produciendo el tejido de la raíz y del aerénquima, los cuales contienen grandes espacios vacíos donde se almacena el oxígeno y lo transportan a diferentes partes de la planta (Ansari, 2016).

Con base en estas diferencias en la estructura vegetal de las macrofitas también se han registrado, variaciones en cuanto a la producción de compuestos con actividad alelopática, en particular con los fenoles. Las hojas de macrofitas sumergidas presentan menor contenido de compuestos fenólicos que las hojas de macrofitas flotantes y emergentes, con 29, 74 y 85 mg g⁻¹ en peso seco, respectivamente. Se sabe que los fenoles en las plantas están involucrados en la defensa contra herbívoros y patógenos y, por lo tanto, estos datos sugieren que las hojas de macrofitas flotantes y emergentes están químicamente mejor protegidas por estos compuestos que hojas de las macrofitas sumergidas.

Una explicación plausible podría ser que las hojas de macrofitas flotantes y emergentes son más vulnerables a los ataques de herbívoros y patógenos que viven en el agua, que al parecer este tipo de macrofitas les son más atractivas por razones nutricionales. En contraparte, se ha reportado que las macrofitas sumergidas contienen menos alcaloides u otros compuestos vegetales secundarios que las macrofitas emergentes o flotantes (Smolders et al., 2000).

2.7 Metabolitos secundarios con actividad alelopática del género *Phragmites*

En la macrofita emergente *Phragmites* se han identificado tres clases principales de metabolitos secundarios con actividad alelopática:

2.7.1 Ácidos orgánicos

Estos compuestos son producidos principalmente en la mitocondria a través del ciclo de Krebs y son almacenados en vacuolas (Liu et al., 2014b; Lopez-Bucio et al., 2000). La acumulación de ciertos ácidos orgánicos en tejidos vegetales o excretados por las raíces actúa como un mecanismo de defensa en condiciones de estrés. Por ejemplo, en condiciones ambientales con altas temperaturas ($< 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) los ácidos orgánicos funcionan como moléculas de señalización en el cierre de estomas, evitando la transpiración del agua por las hojas. También estos compuestos tienen una participación directa en la desintoxicación de la planta causada por metales pesados, formando compuestos quelantes que permiten su circulación a través de los tejidos de la planta y acumulados en vacuolas de donde finalmente son excretados. Este mecanismo le permite a la planta sobrevivir y cambiar a un ambiente favorable para su éxito adaptativo o dar paso a la sucesión de otras especies (Qi-ming et al., 2004; Rejmánková, 2011).

La liberación de compuestos orgánicos mediante la raíz crea una relación estrecha con microorganismos al ser una fuente de carbón y beneficiarse con un intercambio de nutrientes. La presencia de bacterias, al solubilizar elementos como el fósforo y el hierro puede contribuir al crecimiento de la planta (Bais et al., 2006; Nešić et al., 2010).

Los ácidos orgánicos producidos por *Phragmites* (Figura 3) han demostrado tener un efecto de inhibición cuando son liberados de sus residuos vegetales en descomposición, probablemente como un mecanismo de invasión a largo plazo de nuevos ambientes (Armstrong y Armstrong, 1999; Hu y Hong, 2008; Uddin et al., 2014).

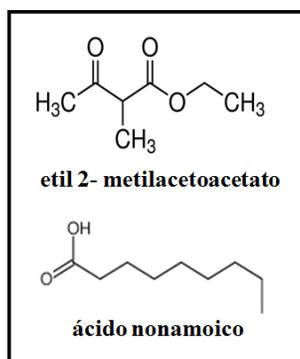


Figura 3. Estructura química de los ácidos orgánicos con actividad antimicrobiana y alelopática en *Phragmites*. El aleloquímico etil 2- metilAcOEtoAcOEtato inhibe el crecimiento de la cianobacteria tóxica *M. aeruginosa* al dañar las funciones metabólicas derivadas de la fotosíntesis (Hong et al., 2009). El ácido nonanoico provoca especies reactivas de oxígeno (ROS) y afecta la organización espacial de la membrana de *M. aeruginosa* (Wang et al., 2011; Shao et al., 2013).

2.7.2 Terpenoides

Constituyen el grupo más abundante y diverso estructuralmente (< 23,000 estructuras identificadas), son producidos normalmente en las hojas y flores y en menor medida en las raíces. Los terpenos son parte esencial del crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que son componentes de clorofilas, carotenoides y plastoquinonas en el proceso de fotosíntesis, en las ubiquinonas que participan en la respiración y en los esteroides que contribuyen a la estructura de las membranas celulares, asimismo también están asociados a hormonas como giberelinas, ácido abscísico y citoquininas (Cheng et al., 2007).

Los terpenos suelen ser compuestos insolubles en agua (Figura 4) y provienen de la ruta del acetato-mevalonato (MVA) y de la vía del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP), derivados de un sólo precursor de cinco carbonos (C₅), isopentenil pirofosfato (IPP).

Los isoprenoides se derivan de dos unidades básicas, el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetil-alil difosfato (DMAPP). En las plantas, estos precursores se sintetizan por dos vías que operan en diferentes compartimentos celulares. La vía mevalónica, presente en el citoplasma y la vía del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP), de reciente descubrimiento, que está confinada a los plástidos. Los pasos de síntesis en el esquema corresponden a la ruta MVA.

En el citosol, el IPP se deriva del ácido mevalónico que proviene del Acetil-CoA en el cloroplasto, DMAPP se forma a partir del piruvato y el gliceraldehído 3-fosfato. Así el hemiterpeno IPP mediante una condensación “cabeza-cola” con DMAPP forma el monoterpeno pirofosfato de geranilo (GPP, C₁₀).

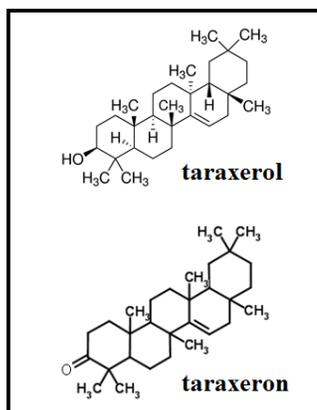


Figura 4. Estructura química de los triterpenos con actividad alelopática. El taraxerol inhibe el transporte de electrones en el sitio donador del fotosistema II y afecta el centro de reacción. Tiene actividad herbicida y antialgal similar al pesticida DCMU (3-(3,4-dichlorofenil-1)-1,1-dimetilurea) (Lopes et al., 2016). El Taraxeron presenta actividad antialgal al fragmentar la membrana celular de cianobacterias (Rudrappa et al., 2009).

Cuando el GPP se condensa con otra unidad de IPP se forma el sesquiterpeno pirofosfato de farnesilo (FPP, C₁₅). Los diterpenos se sintetizan a partir del pirofosfato geranil geraniol (GGPP, C₂₀) que resultan de una condensación de FPP y una unidad de IPP. Dos unidades de FPP mediante una condensación generan el triterpeno, escualeno (C₃₀). La condensación de dos unidades de pirofosfato geranil geraniol da lugar a los tetraterpenos de 40 carbonos (Tholl, 2006) (Figura 5).

El papel ecológico de los terpenos está involucrado en las interacciones planta-ambiente. Terpenos volátiles y no volátiles están implicados en la atracción de polinizadores y depredadores de herbívoros, en la protección contra el estrés foto-oxidativo, mediación en la termotolerancia y en la defensa directa contra microbios e insectos. Estos terpenoides han sido considerados como compuestos propios de plantas invasoras (Mithöfer y Boland, 2012).

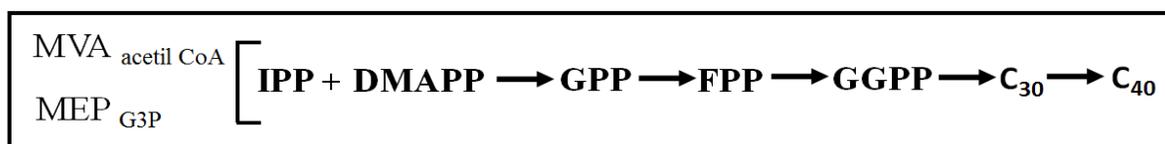


Figura 5. Esquema resumido de la síntesis de terpenos a partir de isoprenoides.

2.7.3 Fenoles

En *Phragmites* los metabolitos secundarios que se han caracterizado mayoritariamente son ácidos fenólicos, de los cuales no todos son funcionalmente alelopáticos. Esta clase de compuestos se caracteriza por una alta diversidad estructural (< 8000 compuestos identificados) con pesos moleculares que van desde < 100 Da, considerados como fenoles simples. Estos se clasifican como cumarinas y ácidos fenólicos que dan origen a dos

grupos, los ácidos hidroxicinámicos como el ácido cinámico, ácido *o*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico y ácido cafeico, entre otros y los ácidos hidroxibenzoicos como el ácido benzoico, ácido *p*-hidrobenzoico, ácido vanílico, ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido siríngico, ácido gentísico, ácido veratrico y ácido salicílico (Chou, 1999; Březinová y Vymazal, 2018; Tazart et al.,2019).

Los fenoles con estructuras mayores a 30,000 Da, son compuestos altamente polimerizados conocidos como polifenoles que comprende a los flavonoides y los taninos que se dividen en hidrolizables y no hidrolizables (Figura 6). Los compuestos fenólicos son ubicuos en plantas y sintetizados como formas solubles o bien asociados a compuestos de la pared celular de todos los tejidos durante el desarrollo normal. Su síntesis también puede ser inducida como respuesta a condiciones de estrés biótico o abiótico, como la infección microbiana, heridas, radiación UV o limitación de nutrientes. Sus funciones generales en la planta son la asimilación de nutrientes, síntesis de proteínas con actividad enzimática en la fotosíntesis, así como también forman parte de componentes estructurales celulares (Li y Hu 2005; Zhou et al. 2006; Uddin et al. 2012, 2017).

Los fenoles son productos químicos muy estables debido a que están constituidos por un anillo bencénico y un grupo hidroxilo. Los fenoles simples caracterizados en *Phragmites* (Figura 7) provienen de la vía del ácido siquímico, a partir de la conversión de simples precursores de carbohidrato, que mediante una condensación de fosfoenol piruvato y eritrosa 4-fosfato resulta el ácido-2-ceto-3-desoxi-7-fosfo-D-glucohéptonico, posteriormente una ciclización forma el ácido-3-dehidroquínico, seguida de una reducción para dar el ácido-3-dehidrosiquímico, que por una parte, por medio de una oxidación y enolización se origina el ácido gálico y una deshidratación y enolización surge el ácido

protocatéquico o mediante NADPH forma el ácido siquímico, este compuesto a su vez es precursor del ácido corismico y del ácido pfeñico dando lugar a la síntesis de fenilalanina de donde provienen los demás fenoles como el ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, que a través de una β -oxidación se obtiene el ácido vanílico (Mandal et al., 2010).

Los fenoles pueden ejercer efecto como moléculas de defensa contra patógenos y herbívoros. Otros efectos están asociados a la disuasión alimentaria de consumidores primarios provocándoles alteración en la digestión y toxicidad. En sistemas acuáticos el efecto sobre las cianobacterias provoca alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular, afectando el intercambio de iones y flujo hídrico (Li et al., 2010; Salminen y Karonen, 2011).

Esta diversidad de mecanismos está regulada por la enzima PAL, precursora de los fenilpropanoides. El papel de los fenoles en las plantas incluye síntesis y expresión de colores y matices, mediante la producción de antocianinas (pigmentos pertenecientes al grupo de los flavonoides) (Kim y Lee, 2011).

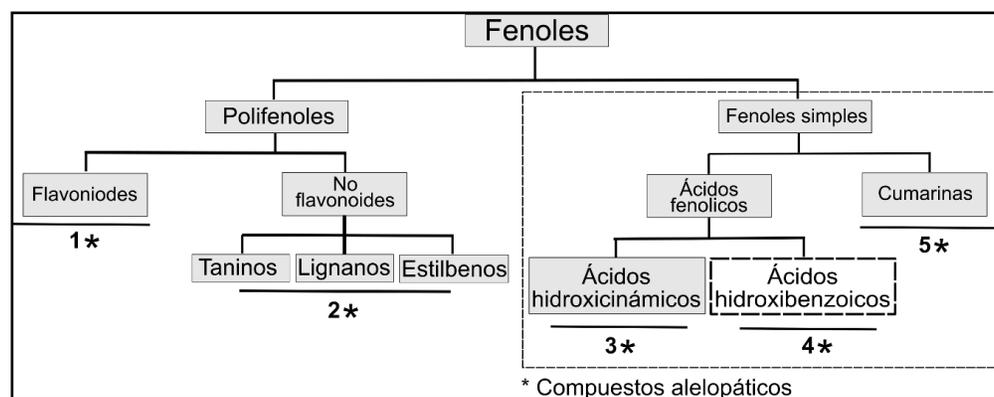


Figura 6. Clasificación del grupo de los fenoles.

1* Comprende los subgrupos de flavonas, flavonoles, isoflavonoles, flavononas, antocianinas y chalconas.

2* Los taninos se dividen en hidrolizables, condensados y complejos.

3* Fenoles simples que comprende compuestos como el ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sináptico.

4* En este grupo están compuestos como el ácido gálico, ácido vanílico, ácido protocatéuico, ácido siríngico, ácido gentísico.

5* Las cumarinas están constituidos por compuestos como cumarinas, psoralenos, scopoletin y esculentin (Stintzing y Carle, 2004; Bolser et al., 2013).

Las antocianinas además, actúan como atrayentes de polinizadores y participan en la dispersión de semillas. Otra característica de estos compuestos es que funcionan como pantallas de luz contra la radiación dañina como la luz UV, son vehículos de transporte de monosacáridos y actúan como osmoreguladores durante los periodos de sequía y bajas temperaturas. Todos los compuestos fenólicos presentan actividad antioxidante, incrementando la respuesta al daño oxidativo manteniendo el estado fisiológico normal de los tejidos, afectados por el estrés biótico o abiótico (Stintzing y Carle, 2004; Bolser et al., 2013). En el género *Phragmites*, los compuestos fenólicos también son propuestos como sustancias que brindan una ventaja adaptativa cuando se implantan en nuevos ambientes terrestres y como vegetación ripariana, mediante lo cual logran desplazar a las especies nativas (Cao et al., 2008; Březinová y Vymazal, 2018)

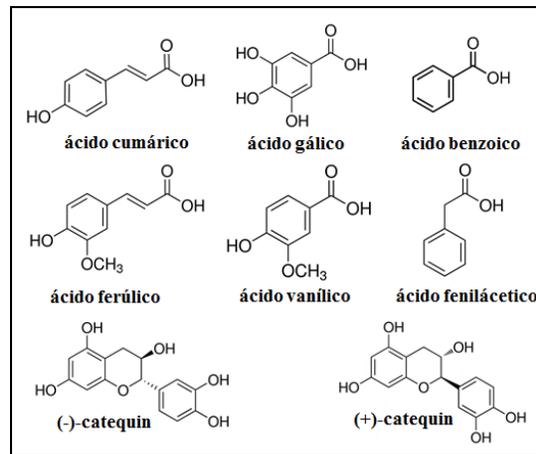


Figura 7. Estructura química de algunos fenoles evaluados en bioensayos que presentan actividad alelopática sobre cianobacterias. (Stintzing y Carle, 2004; Bolser et al., 2013).

En resumen, la capacidad que tiene *Phragmites* para producir estos tres tipos de metabolitos secundarios, los cuales forman parte de un mecanismo propio de las plantas invasoras que da origen a la “hipótesis de armas novedosas” (NWH por sus siglas en inglés: Novel Weapons Hypothesis) (Mithöfer y Boland, 2012). Este potencial de producir sustancias bioactivas también se ha utilizado como una estrategia dirigida a la rehabilitación de los sistemas acuáticos con presencia de floraciones de cianobacterias (Li et al., 2010; Salminen y Karonen, 2011).

2.8 Problemática de florecimientos algales por cianobacterias en los sistemas acuáticos

Las cianobacterias son organismos autótrofos fotosintéticos que habitan en prácticamente todos los sistemas acuáticos. Forman parte de los productores primarios y fuente de alimento que sostiene la productividad secundaria, pero en condiciones de crecimiento favorables las cianobacterias suelen ser las especies dominantes (Davidson et al., 2012).

Particularmente, en los cuerpos de agua la calidad del recurso hídrico ha ido en decremento debido a que el uso de fertilizantes en la agricultura y los efluentes domésticos e industriales aportan un exceso de nutrientes que incrementa las concentraciones de nitrógeno y fósforo provocando su eutrofización (Graneli et al., 2008). Adicionalmente, el actual incremento de temperatura y la persistencia de las altas concentraciones de nutrientes han promovido la recurrencia en la proliferación de cianobacterias hasta formar los llamados florecimientos (Heisler et al., 2008; Harke et al., 2012). Estos cúmulos de cianobacterias llegan a estar constituidos entre un 50 a 70% por especies tóxicas que producen cianotoxinas y de las cuales se ha identificado al menos 14 géneros que son capaces de producirlas (Skulberg et al. 1993; Ouellette y Wilhelm 2003).

Estas sustancias bioactivas son endotoxinas que pueden ser liberadas al medio a través de la lisis celular, por senescencia o por rompimiento debido a los tratamientos con alguicidas para el control de estos florecimientos (Kenefick *et al.*, 1993; Meriluoto *et al.*, 2005). Las cianotoxinas se clasifican de acuerdo con el daño que ocasionan a los seres humanos y por su mecanismo de acción, síntomas y los órganos que afecta. Se dividen en hepatoxinas (hígado), neurotoxinas (sistema nervioso), dermatoxinas (toxinas irritantes) y citotoxinas (daño celular con efecto a distintos órganos como hígado, riñones, glándulas suprarrenales e intestino delgado) (Corbel et al. 2014). Son compuestos con estructura química de péptidos cíclicos cuyos efectos pueden ser directos o indirectos al mostrar una acción inmediata o causar un daño posterior debido a la bioacumulación (Leflaive y Ten-Hage 2009) (Figura 8). Entre las cianotoxinas, la microcistina-LR (MC-LR) es el compuesto con mayor recurrencia cuando se presentan los florecimientos por *Microcystis aeruginosa*, la cual es una de las especies predominante en los sistemas acuáticos y es capaz de producir en mayor proporción esta toxina (Van Apeldoorn et al., 2007).

El efecto de las microcistinas en el ambiente acuático ha sido probado sobre especies de diversos niveles tróficos como son organismos del zooplancton, peces, moluscos, nematodos y plantas (Burkholder et al., 2018). Estas investigaciones contribuyen al conocimiento sobre el alcance del daño que puede generar la presencia de las cianotoxinas, pues las consecuencias ecológicas incluyen: disminución del crecimiento poblacional de microorganismos y organismos eucariotas, reduce el pastoreo del zooplancton, en las especies sensibles provoca efectos negativos en el desarrollo y reproducción, así también estas toxinas interrumpen las cadenas alimentarias por efecto directo o por acumulación en los individuos (Christoffersen, 1996; Burkholder et al., 2018; Pham y Utsumi, 2020).

Una de las funciones propuestas para las microcistinas (MC) es inhibir el crecimiento de otros organismos acuáticos, disminuyendo el número de especies que puedan competir por los recursos.

Mediante las MC, las cianobacterias pueden afectar a otras especies del fitoplancton y reduciendo las poblaciones del zooplancton que resultan ser sus depredadores (Whitton y Potts, 2012; Nandini et al., 2019, 2020). Sin embargo, no se conoce con certeza la función metabólica de la producción de las cianotoxinas, ya que no se ha demostrado la participación directa de estas toxinas en los procesos de crecimiento y división celular en las cianobacterias (Pimentel y Giani, 2014; Pham et al., 2020).

Por otro lado, el costo energético vinculado a los procesos enzimáticos involucrados en la síntesis de microcistinas, sugiere que estos metabolitos secundarios tienen un papel más general en las funciones fisiológicas y ecológicas de las cianobacterias (Carmichael, 1992; Falconer y Humpage, 2006). Se ha reportado que las microcistinas están relacionadas en la regulación lumínica y la adaptación cromática (Kaebernick et al., 2000) y pueden actuar

como moléculas encargadas de rastrear compuestos de hierro volviéndolos asimilables, funcionales y necesarios en el proceso fotosintético, por lo que se piensa que las MC están asociadas al transporte celular del hierro (Utkilen y Gjølme, 1995). Otra hipótesis sobre la función de las cianotoxinas, es que son solo sustancias de reserva y tienen un efecto adverso contra otros organismos asociados a los cuerpos de agua (Carmichael, 1997; Christoffersen, 1996), además se piensa que las MC actúan como reguladores que ayudan a las cianobacterias a su proliferación celular y éxito adaptativo al medio (Sedmak y Kosi, 1998).

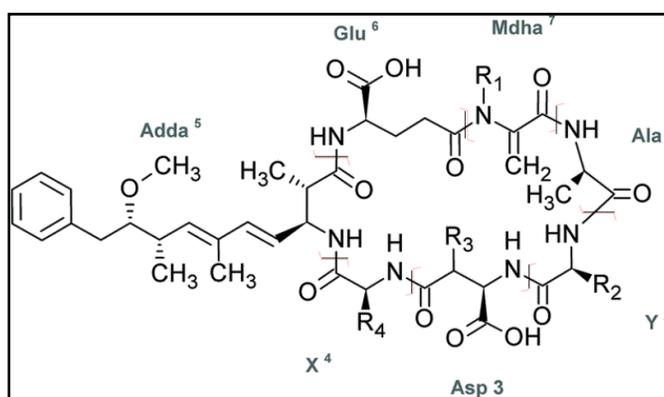


Figura 8. Estructura química general de la microcistina.

Se enumera la posición de cada aminoácido en la estructura y su separación con una línea. Y² y X⁴ corresponde a los aminoácidos sustituibles que dan lugar a las variantes de la toxina. Se han reportado más de 85 variantes de microcistinas en géneros de cianobacterias tóxicas, de las cuales todas ellas son heptapéptidos cíclicos conformada por: ciclo - (D-Ala1 - L Y² - D-MeAsp3 - R X⁴ - Adda-Arg5 - D-Glu6 - Mdha7 -). De los siete aminoácidos, cinco de ellos no varían: D-alanina en la posición 1, D-metil ácido aspártico en la posición 3, Adda (3-amino-9-metoxi-2, 6, 8-trimetil-10-fenil-4, 6-ácido dienoico) posición 5, D-ácido glutámico en posición 6 y N-metildihidroalanina en posición 7. La microcistina-LR (MC-LR) es la cianotoxina más recurrente y estudiada de los sistemas acuáticos, es producida por *Microcystis aeruginosa* y está conformada de las variantes de aminoácidos leucina (L) en posición 2 y arginina (R) en la posición 4 (Van Apeldoorn et al., 2007; Benke et al., 2015).

2.9 El papel de las macrofitas en el estudio de la alelopatía

El estudio de las macrofitas como organismos con potencial alelopático incluye individuos en hábitats acuáticos con crecimiento sumergible, flotante y emergente. Los dos primeros tipos han sido mayormente estudiados debido a su recurrencia en lagos y estanques con una alta carga de nutrientes (Addisie y Medellín, 2012; Chang et al., 2012). Debido a que en la naturaleza se observó que alrededor de estas plantas las poblaciones del fitoplancton eran menores, se estudiaron tanto compuestos liberados al medio como compuestos que fueron aislados de los tejidos de estas plantas para ser evaluados posteriormente en sistemas *in vitro*. (Choi et al., 2009; Davidson et al., 2012) Algunos de estos compuestos pertenecían principalmente al grupo de los fenoles simples, resultaron tener un efecto de inhibición sobre especies de cianobacterias. Como se sabe, los fenoles son ubicuos en las plantas, por lo que el estudio de la alelopatía se extendió a las macrofitas emergentes con el propósito de evaluar si los fenoles también contribuyen en gran parte al efecto alelopático que muestra en general el grupo de las macrofitas (Gao et al., 2011; Chang et al., 2017; Březinová y Vymazal, 2018).

De esta forma, los estudios revisados para esta investigación se basan en los tres tipos de macrofitas y la evaluación de los aleloquímicos sobre el crecimiento de cianobacterias y otros individuos del fitoplancton.

2.10 Alelopatía de macrofitas sumergibles y flotantes

Körner y Nicklisch (2002), compararon el efecto alelopático de las macrofitas sumergibles *Myriophyllum spicatum*, *Ceratophyllum demersum* y *Potamogeton pectinatus*, las cuales produjeron polifenoles hidrolizables de bajo peso molecular (< 1000 kDa), sobre las cianobacterias tóxicas *A. flos-aquae*, *M. aeruginosa*, *P. agardhii* y la clorofita *Tetrademus armatus*. Los resultados mostraron que las macrofitas *M. spicatum* y *C. demersum* inicialmente inhibieron la actividad del fotosistema II (PSII) provocando un decremento en el crecimiento de las cianobacterias *M. aeruginosa*, *P. agardhii* y en menor medida de *A. flos-aquae* y *S. armatus*. Mientras que *P. pectinatus* no presentó efecto negativo sobre los organismos. Los autores mencionaron que el efecto de los fenoles fue distinto de acuerdo con la especie de macrofita, por lo que las cianobacterias mostraron una sensibilidad específica.

Shanab et al. (2010) evaluaron el efecto antialgal de un extracto crudo metanólico (cargados en discos de papel) de *Eichhornia crassipes* sobre las cianobacterias *Spirulina platensis* y *Nostoc piscinale* y las microalgas *C. vulgaris* y *Dictyochloropsis splendida*. El extracto produjo una zona de inhibición solo para la microalga *C. vulgaris*, por lo que, al realizar un análisis fitoquímico del extracto, los resultados mostraron que la proporción de sustancias que presentó la planta fue de 0.98% de alcaloides, 4.35% de fenoles y 1.53% de terpenoides. Los autores encontraron a través de cromatografía de gases-masas (GC/MS, en inglés) que el compuesto que generó este efecto fue un alcaloide (18, 19-Seco-15 beta-yohimb), el cual mostró mayor actividad de inhibición al ser aislado y evaluado por

separado. Esto indica que los fenoles a pesar de encontrarse en mayor proporción en el extracto no presentaron efecto alelopático.

Wang et al. (2010), analizaron la composición química de *Potamogeton malaianus* y *Potamogeton maackianus* a partir de una fracción primaria de acetato de etilo proveniente de un extracto acuoso y probado sobre *M. aeruginosa*. Los resultados mostraron que una concentración de 60 mg L⁻¹ del extracto inhibe el crecimiento de la cianobacteria en un 53.5 y 58.1 % por *P. malaianus* y *P. maackianus*, respectivamente. En las fracciones de acetato de etilo se identificaron como principales compuestos alelopáticos al ácido palmítico (ácido graso), ácido láctico (ácido orgánico hidroxílico) y el ácido benzoico (ácido fenólico). Estos compuestos fueron evaluados individualmente y la dosis media de inhibición fue de 50 %, de acuerdo con los autores, el efecto alelopático fue mayor cuando los compuestos actuaron en sinergia como lo estuvieron en un extracto crudo.

Nakai et al. (2012), determinaron la contribución alelopática de cinco ácidos fenólicos (eugeniina, ácido gálico, ácido elágico, (+) catequina y ácido pirogálico) y tres ácidos grasos (ácido nonanoico, ácido *cis*-6-octadecenoico y ácido *cis*-9-octadecenoico), los cuales fueron previamente identificados en extractos acuosos en la macrofita *M. spicatum*, estos compuestos fueron evaluados sobre el crecimiento de *M. aeruginosa* y los resultados mostraron que el efecto de inhibición en los cultivos por los ácidos fenólicos y ácidos grasos fue del 53%, por lo que el efecto pudo deberse a la sinergia entre los dos grupos o incluso a otro tipo de compuestos diferentes que estaban contenidos en el extracto.

Wu et al. (2013), analizaron el efecto de inhibición y el posible impacto ecológico de los extractos de *Pistia stratiotes* sobre *M. aeruginosa* y su producción de microcistina-LR (MC-LR). Los extractos crudos fueron obtenidos a partir de distintos disolventes (metanol,

acetato de etilo y hexano), de los cuales el que presentó el mayor efecto antialgal fue el extracto obtenido con acetato de etilo, el cual se probó a una concentración de 65 mg L⁻¹, dando como resultado de un 50 a un 75% de inhibición en un periodo de 3 a 7 días, asimismo la exposición de *M. aeruginosa* a estos extractos no generó incremento de la MC-LR disuelta. Sin embargo, las concentraciones de MC-LR intracelular presentaron un aumento proporcional al incremento en la concentración de los extractos durante los 7 días del ensayo, posteriormente la concentración se redujo y la concentración de la MC se mantuvo estable hasta el día 16. Por lo tanto, los autores explican que la aplicación de los extractos de *P. stratiotes* es ecológicamente seguro tanto en los sistemas naturales como en los sistemas de tratamiento de agua.

2.11 Alelopatía de macrofitas emergentes

Smolders et al. (2000), investigaron el contenido fenólico de las hojas de 40 especies de macrofitas sumergidas, flotantes y emergentes (no incluyeron el género *Phragmites*), estos ejemplares fueron recolectadas en rodales distribuidos en los Países Bajos. Las especies de macrofitas con hojas sumergidas mostraron un contenido fenólico significativamente más bajo que las especies con hojas emergentes o flotantes, y entre estos dos últimos tipos no se observaron diferencias significativas. Los autores atribuyeron las diferencias entre las macrofitas evaluadas como parte de una serie de estrategias de defensa a los ataques por herbívoros y patógenos que suelen ser más abundantes en comparación de cuando se encuentran bajo el agua.

Li y Hu (2005), evaluaron el efecto alelopático de extractos obtenidos de *P. australis* sobre el crecimiento de *M. aeruginosa*, *C. pyrenoidosa* y *C. vulgaris*. En los extractos fue identificado el compuesto etil 2-metilacetoacetato (EMA, ethyl 2-methylacetoacetate), el cual presentó efecto de inhibición sobre *M. aeruginosa* y *C. pyrenoidosa*, mientras que en *C. vulgaris* no se observó efecto, lo que reitera una actividad especie-específica de los aleloquímicos. Los autores mencionaron que en los extractos también se identificó el compuesto etil-levulinato (precursor químico del etil 2-metilacetoacetato), sin embargo, este no mostró efecto sobre la cianobacteria ni las clorofitas. Por lo que no todos los precursores de los aleloquímicos mostraron efecto alelopático.

Mulderij et al. (2006), evaluaron el efecto alelopático de la macrofita emergente *Stratiotes aloides* mediante la liberación de sustancias activas al agua de un estanque (Holanda) en un experimento *in situ*, y demostraron una reducción del fitoplancton debido a la cercanía con *S. aloides* por efecto de los exudados. Sin embargo, al evaluar este efecto sobre las especies presentes en el fitoplancton, se encontró que las cianobacterias no mostraron efecto de inhibición a los exudados, entendiéndose que estas sustancias no tienen efecto específico sobre este grupo.

Men et al. (2007), evaluaron el efecto alelopático del éster conocido como EMA obtenido de extractos de *P. australis* sobre las especies de clorofitas *T. obliquus*, *S. capricornutum* y *C. reinhardtii*, para ampliar el concepto de actividad alelopática especie-específico dentro del grupo de las clorofitas. Se encontró que el EMA tuvo efecto inhibitorio durante los ocho días de experimentación sobre *S. capricornutum*, en el caso de *T. obliquus* el efecto se mantuvo solo en los primeros cuatro días, después de este periodo desapareció y en cambio se observó un efecto estimulante. No se observó ningún efecto en *C. reinhardtii*.

Cao et al. (2008), examinaron la relación del carbono y nitrógeno asociada a la producción de fenoles totales en hojas de siete macrofitas sumergibles, cuatro macrofitas flotantes y cuatro macrofitas emergentes. Los resultados mostraron que las hojas de las macrofitas flotantes y emergentes presentaron hidratos de carbono solubles y fenoles totales más altos que en las hojas de las macrofitas sumergibles. Para el caso de *P. australis* el contenido promedio de fenoles totales fue de $16.9 \pm 3.7 \text{ mg g}^{-1}$, y observándose un coeficiente de correlación mayor con los hidratos de carbono (0.40) que con los aminoácidos libres (-0.07). Se observó que en general, para las macrofitas flotantes y emergentes existió una relación estrecha entre hidratos de carbono y fenoles totales. Los autores refirieron que estos dos últimos tipos de plantas presentaron una actividad fotosintética bruta mayor y una biomasa máxima estacional en comparación con las macrofitas sumergibles. Por otra parte, la disponibilidad de luz y CO_2 en la columna de agua pudo ser un factor limitante para la formación de carbohidratos en las macrofitas sumergibles, contrario a lo que sucedió en las macrofitas flotantes y emergentes, las cuales aprovecharon de manera más eficiente la disponibilidad de estos recursos.

Uddin et al. (2012), estudiaron la distribución de los aleloquímicos en la hoja, tallo, raíz y rizoma de *P. australis*, mediante la cuantificación de fenoles totales. Los resultados mostraron que en la hoja se encontró la mayor cantidad de fenoles totales, seguido por el sistema radicular y en menor medida el tallo.

Wu et al. (2013), investigaron los efectos alelopáticos de lixiviados foliares, volátiles de hojas, exudados de raíces y descomposición residual de *P. stratiotes* sobre *M. aeruginosa*. Los resultados de la distribución de los tipos de sustancias alelopáticas de la planta mostraron que los exudados de raíz exhibieron el efecto inhibitor más fuerte sobre el

crecimiento de *M. aeruginosa*, seguido por los de la descomposición del residuo y los lixiviados de las hojas. Por el contrario, los volátiles de la hoja estimularon el crecimiento de *M. aeruginosa*. Los exudados de raíz que inhibieron el crecimiento de esta cianobacteria actuaron reduciendo el contenido de ficocianina, lo que incrementó los valores de conductividad eléctrica y el radical anión superóxido (O_2^-), causando daño oxidativo y destrucción de la membrana celular de *M. aeruginosa*.

Zhang et al. (2015b), evaluaron el efecto alelopático de tres macrofitas emergentes *A. calamus*, *Oenanthe javanica* y *Sagittaria sagittifolia* a partir de extractos crudos obtenidos mediante etanol, acetato de etilo y hexano, sobre monocultivos de tres cianobacterias tóxicas, *M. aeruginosa*, *D. flos-aquae* y *Aphanizomenon flosaquae*, así como en mesocosmos naturales de fitoplancton en los que se incluyeron estas tres especies. Los resultados demostraron que los monocultivos de *D. flos-aquae* y *A. flosaquae* fueron sensibles a los extractos con hexano de las tres macrofitas, obteniendo un efecto de concentración media (EC_{50}) con 10 y 20 mg L⁻¹ a las 72 h, mientras que *M. aeruginosa* fue más sensible al extracto mostrando una EC_{50} con 9.23 mg L⁻¹. En los mesocosmos naturales la EC_{50} se presentó a una concentración de 48.75 mg L⁻¹. Los autores explicaron que los resultados se debieron a la diferencia en la sensibilidad de cada cianobacteria a los compuestos activos como un efecto especie-específico, y no por a una especie de macrofita en particular.

De acuerdo con los antecedentes, las investigaciones en alelopatía por las especies de macrofitas emergentes y en particular con *P. australis*, han atribuido el efecto de inhibición principalmente al éster denominado EMA. Sin embargo, los compuestos pertenecientes al

subgrupo de los ácidos fenólicos están presentes en las macrofitas. En estas se han reportado compuestos como el ácido cumárico, el ácido gálico, el ácido catequínico, el ácido benzoico, el ácido ferúlico y el ácido vanílico como responsables del efecto alelopático. Sin embargo en *P. australis* no se conoce si la planta tiene el potencial de producir específicamente estos fenoles con actividad alelopática en condiciones asociadas a los sistemas acuáticos, tal como se ha reportado para las especies de macrofitas flotantes y sumergibles.

2.12 Problemática de cianobacterias en el embalse de Valle de Bravo y uso de macrofitas para la rehabilitación de cuerpos de agua

Alillo et al. (2014), determinaron la presencia de microcistinas (equivalentes de MC-LR) y su relación con poblaciones tóxicas de cianobacterias en el embalse de VB durante febrero a noviembre de 2010. La presencia de MC-LR se asoció con el biovolumen de *D. planctonicum* de febrero a junio, particularmente en abril con la mayor concentración de MC-LR registrada con $5.56 \mu\text{g L}^{-1}$. Se encontraron otras cianobacterias tóxicas que también contribuyen en menor medida a la presencia de cianotoxinas como *Limnoraphis birgei*, *Woronichinia naegeliana*, *P. agardhii*, *P. mucicola* y *Microcystis* spp.

Valeriano-Riveros et al. (2014), realizaron un estudio en el embalse de VB de 2008 a 2009 sobre la fluctuación en el nivel del agua y la dominancia de cianobacterias. Las especies dominantes fueron *Cyclotella ocellata*, *Fragilaria crotonensis*, *W. naegeliana* y *Microcystis wesenbergii*. El incremento de estas cianobacterias se atribuyó a la disminución en el nivel

del agua del embalse, un aumento en el aporte de nutrientes y un incremento de la temperatura ($> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante los meses de marzo a octubre.

Olguín et al. (2017), evaluaron el desempeño de dos islas flotantes con macrofitas (IFM) emergentes, cada una de ellas con *Pontederia sagittata* y *Cyperus papyruspara* en la remoción de nutrientes, oxígeno disuelto y clorofila-a como un indicador indirecto de la abundancia del fitoplancton. Las IFM fueron colocadas en un estanque artificial eutrofizado de 30 cm de profundidad en el centro de Xalapa, Veracruz - México, llamado “Los Lagos del Dique” durante los años de 2014 a 2016. Las IFM lograron reducir los nitratos hasta un 76%, el oxígeno disuelto aumento en un 67%, sin embargo, la clorofila aumentó 1.4 veces más con respecto al inicio del estudio. Los autores mencionaron que las condiciones ambientales como la temperatura e intensidad de luz durante los meses de marzo a noviembre fueron responsables del incremento del fitoplancton.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial aleloquímico de la macrofita *Phragmites australis* bajo condiciones de crecimiento en laboratorio y ambiental, sobre la densidad celular de especies del fitoplancton.

3.1 Objetivos particulares

- Determinar y comparar el contenido de fenoles totales en órganos vegetales y exudados de *P. australis* bajo tres condiciones de crecimiento: dos de ellas en laboratorio bajo condiciones óptimas de nutrientes y luz, y bajo condiciones deficientes de estas variables, así mismo en condición ambiental en el embalse de Valle de Bravo.
- Evaluar el rendimiento de extracción de fenoles totales con el uso de tres disolventes orgánicos en hoja, tallo y rizoma de *P. australis* y sus exudados. Asimismo, analizar por cromatografía de capa fina, de alto rendimiento y gases - masas la presencia de fenoles con potencial alelopático.
- Determinar la presencia de seis fenoles con potencial alelopático (ácido cumárico, ácido gálico, ácido catequínico, ácido benzoico, ácido ferúlico y ácido vanílico) en los extractos obtenidos a partir de las estructuras vegetales y exudados de *P. australis*, utilizando estándares químicos de cada uno de los compuestos propuestos y analizados mediante cromatografía de capa fina, de alto rendimiento y gases - masas.

- Evaluar del efecto alelopático de los extractos acuosos de los órganos vegetales y exudados de *P. australis*, sobre el crecimiento de la cianobacteria tóxica *Microcystis aeruginosa* y la clorofita *Tetradismus obliquus*, a través del conteo celular directo.
- Evaluar del potencial alelopático de *P. australis* ambiental bajo un sistema de isla flotante con macrofitas operante en el embalse de Valle de Bravo, Edo. Mex, México, sobre el fitoplancton y particularmente en cianobacterias tóxicas.

4. HIPÓTESIS

La macrofita emergente *Phragmites australis* ha sido frecuentemente utilizada en la restauración de los sistemas acuáticos eutrofizados debido a que reduce los niveles de contaminantes y nutrientes. Asimismo *P. australis* ha mostrado también reducir las poblaciones algales a través de compuestos alelopáticos. Este tipo de compuestos comprende particularmente a seis aleloquímicos del grupo de los fenoles, los cuales han sido analizados de manera independiente en otras macrofitas asociadas a ambientes terrestres o totalmente acuáticos. Dado que estos compuestos son ubicuos en las macrofitas, comprobar su presencia en la macrofita emergente *P. australis* contribuiría a entender cómo esta macrofita es capaz de disminuir las floraciones algales. Además de evaluar si la presencia de estos aleloquímicos es afectada por condiciones ambientales en un gran cuerpo de agua eutrofizado o por condiciones de laboratorio con limitación de nutrientes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de organismos

5.1.1 *Phragmites australis*

Las plantas utilizadas de *Phragmites australis* ((Cav.) Trin. ex Steud.) son nativas de un humedal natural dentro del manantial denominado “La Mintzita” (19°37’40” N, 101°15’22” O) (Colin y Eguiarte, 2016), el cual se encuentra ubicado a 7.5 kilómetros al Suroeste de la ciudad de Morelia, Michoacán. Se recolectaron plantas adultas de *Phragmites* que incluían el sistema radicular, estas fueron llevadas a un vivero en el Estado de México para su mantenimiento y reproducción en sustrato sólido que incluía una mezcla de tierra y hojarasca. Las plantas fueron propagadas por esqueje y el desarrollo de cada plántula tomó un tiempo de 10 a 15 semanas hasta tener plantas de 1 a 1.5 m de altura aproximadamente. Las nuevas plantas de *Phragmites*, referidas como PhgA, fueron utilizadas en el modelo de IFM en el embalse de Valle de Bravo, Estado de México (Figura 9).

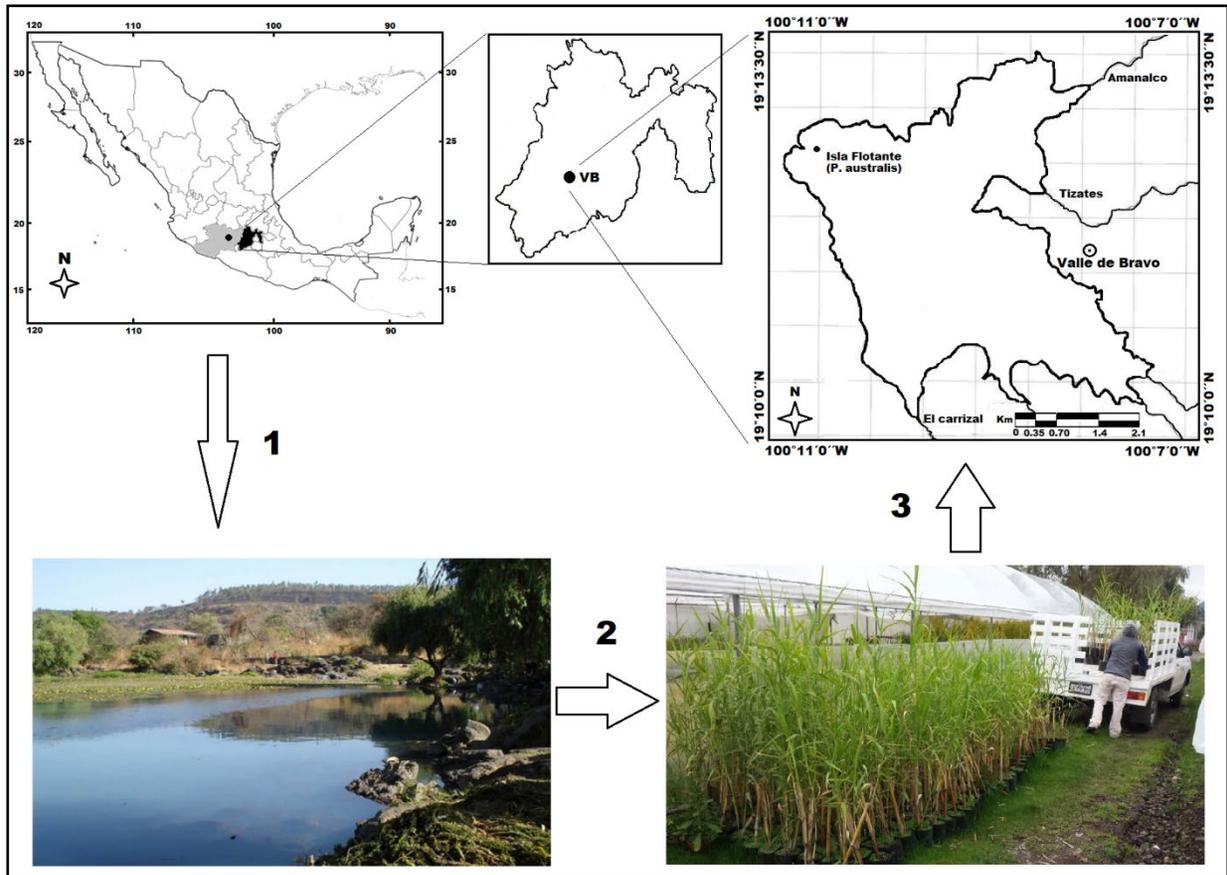


Figura 9. Mapa de ubicación de *Phragmites*. Cuadro superior izquierdo: mapa de México, se muestra en gris el estado de Michoacán, el punto negro señala la ubicación del manantial “La Mintzita”, sitio de recolecta de *P. australis* (1). Propagación de *P. australis* en un invernadero del Estado de México (2), marcado en negro en el mapa de México. Las macrofitas entre 1 y 1.5 m de altura fueron llevadas a Valle de Bravo en el Estado de México, cuadro superior medio. Estas plantas fueron utilizadas para la implementación del modelo de isla flotante que se encuentra en el área de obra de toma en el embalse de Valle de Bravo (3), cuadro superior derecho.

Para las pruebas en laboratorio, una fracción de la colecta original del manantial “La Mintzita” fue mantenida en el invernadero en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. En el invernadero las plantas fueron lavadas con agua corriente para retirar el sustrato original y dejar sin residuos el sistema radicular. Posteriormente, las macrofitas fueron colocadas dentro de tinas de plástico de 40 L y en las que se vaciaron 10 L de solución nutritiva al 2% como medio de mantenimiento para su crecimiento (solución nutritiva: 7.99 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.99 g KH_2PO_4 y 0.8619 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1000 mL,

Avendaño Rivera y Espinoza 2018). El recambio del medio se realizó una vez por semana para evitar la acumulación de desechos o descomposición de materia orgánica, además las tinas fueron cubiertas por la parte superior con plástico negro para evitar el crecimiento de algas y dejando un orificio para que sobresaliera el tallo. Una vez que las macrofitas presentaron nuevas plántulas sobre el tallo principal, se cambió el medio de mantenimiento por medio de cultivo Z8 (NaNO_3 : 4.67 g L^{-1} , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.59 g L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.25 g L^{-1} , K_2HPO_4 : 0.31 g L^{-1} , Na_2CO_3 : 0.21 g L^{-1} , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.0028 g L^{-1} , $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.003 g L^{-1} , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: $.009 \text{ g L}^{-1}$, KBr : 0.12 gL , KI : 0.008 g L^{-1} , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.029 g L^{-1} , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.016 g L^{-1} , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.015 g L^{-1} , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.013 g L^{-1} , $\text{NiSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.02 g L^{-1} , $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: 0.004 g L^{-1} , V_2O_5 : 0.0009 g L^{-1} , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3\text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.048 g L^{-1} , H_3BO_3 : 31.0 g L^{-1} , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.022 g L^{-1} , Staub, 1961; Kótai, 1972; NIVA, 1976), y se mantuvieron las mismas condiciones de cuidado en su crecimiento y con la misma frecuencia de recambio del medio (Figura 10). Cuando las plantas alcanzaron una talla aproximada entre 2.0 a 2.5 m fueron empleadas para los ensayos bajo condiciones de crecimiento en laboratorio, a estos ejemplares de *Phragmites* se les nombró como PhgL.

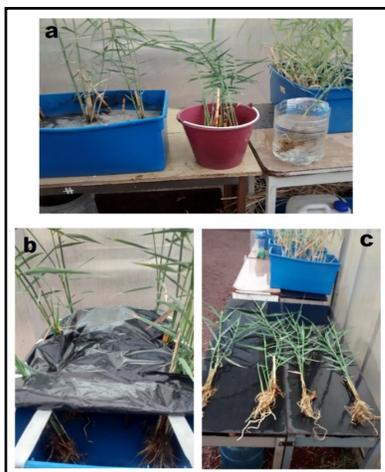


Figura 10. Crecimiento de *Phragmites* en invernadero FESI. a) Mantenimiento y lavado del sistema radicular de *Phragmites*. b) Adaptación al medio acuoso en medio de cultivo Z8. c) Obtención de nuevas plantas para los ensayos de laboratorio.

5.1.2 *Microcystis aeruginosa* y *Tetrademus obliquus*

La cianobacteria *M. aeruginosa* ((Kützing) Kützing 1846: 6) fue aislada de una muestra ambiental del embalse de Valle de Bravo, para su identificación se utilizaron las claves taxonómicas de Komárek y Anagnostidis (1999) y Komárek (2003). La microalga verde *T. obliquus* (Turpin) M. J. Wynne 2016, fue adquirida de la colección Hortobagy No.72 de la Universidad de Texas, USA. Ambas especies fueron crecidas y mantenidas por separado en monocultivos con medio Z8 en matraces Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de 200 mL de medio. El crecimiento de los cultivos se mantuvo en movimiento usando un agitador orbital a 70 rpm (Orbit 1900, Labnet), con una temperatura de 28 ± 2 °C, pH 6.8 y una radiación lumínica de $90 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la cual se midió con un sensor semiesférico MQ-200, Apogee Instruments, se usaron lámparas fluorescentes de luz fría (Azoo Tri-Power Light, 30 W) y se sometieron a un fotoperiodo de 14:10 h (luz-oscuridad).

5.2 Determinación y comparación del contenido de fenoles totales en órganos vegetales y exudados de *Phragmites australis* bajo tres condiciones de crecimiento

Los ejemplares colectados en el manantial “La Minzita”, se dividieron en dos lotes, uno de ellos se trasladó al invernadero de la FES Iztacala para los ensayos en laboratorio. Un segundo lote se utilizó para realizar la propagación de las macrofitas, las cuales se colocaron en la IFM en el embalse de Valle de Bravo.

5.2.1 *Phragmites australis* bajo condiciones de crecimiento en laboratorio

El primer lote de plantas de *P. australis* (propagadas y crecidas previamente en el invernadero de la FES-I) fueron empleadas para los ensayos en laboratorio (en adelante como PhgL). Estas plantas se colocaron bajo dos condiciones de crecimiento: i) Control como PhgL C ($n=3$), en las cuales se utilizó la formulación original del medio de cultivo Z8. En un vaso de precipitado de cristal de 1000 mL se colocó una planta de *P. australis* con 500 mL de medio Z8, quedando el sistema radicular sumergido dentro del vaso y la zona aérea de la planta expuesta a la radiación lumínica. El vaso fue cubierto por el exterior de las paredes con aluminio para evitar la incidencia de luz en la raíz y en la parte superior del vaso se utilizó una gasa con un orificio para dejar salir el tallo, para evitar la contaminación externa del medio. Las concentraciones de nutrientes en el medio Z8 fueron: 4.67 g L⁻¹ de nitrógeno como NaNO₃ y 0.31 g L⁻¹ de fósforo como K₂HPO₄ con una irradiancia lumínica de 90 μmol de fotones m⁻² s⁻¹. ii) Estrés como PhgL E, se utilizó medio de cultivo Z8 con una cuarta parte de la concentración original de los macronutrientes de nitrógeno y fósforo, es decir: 1.17 g L⁻¹ de NaNO₃ y 0.08 g L⁻¹ de

K_2HPO_4 con una irradiancia lumínica de $10 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Estas plantas fueron crecidas bajo las mismas condiciones de cultivo en los vasos de precipitado que las plantas PhgL C.

El ensayo experimental tuvo una duración de veinte días, del cual se tomó una muestra de 3 mL del medio de cultivo cada dos días para cuantificar por colorimetría (Kit Nitrate-Nitratetest y Phosphate LR, YSI 9500) las concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-} en el medio y por diferencia de la cantidad inicial en el medio obtener la concentración asimilada por las plantas. Posteriormente, al término del periodo experimental, las plantas fueron secadas y separados sus órganos vegetales en hoja, tallo y rizoma, se pesaron 5 g de biomasa en peso seco (PS) de cada órgano para macerarlos y obtener el extracto acuoso, el cual se liofilizó para posteriormente utilizarlo en la cuantificación de FT. Para comprobar la estabilidad del medio de cultivo durante el periodo experimental, se colocaron vasos de precipitados de cristal con el mismo volumen de medio de cultivo, sin plantas, y bajo las mismas características de exposición a las condiciones de los vasos con plantas (Figura 11).

A través de la deficiencia de nutrientes y luz, se evaluó si la elección de estos factores promueve un incremento en la concentración de FT por estrés, como sucede en algunas macrofitas, de acuerdo con la literatura (Plaxton 2004; Gawronska y Golisz 2006; Muhammad y Majeed 2020). También, se evaluó la tasa de consumo para nitratos y fosfatos (Jakubaszek 2021), y con ello se relacionó la disponibilidad y asimilación de estos nutrientes con la producción de FT en estas condiciones de laboratorio.

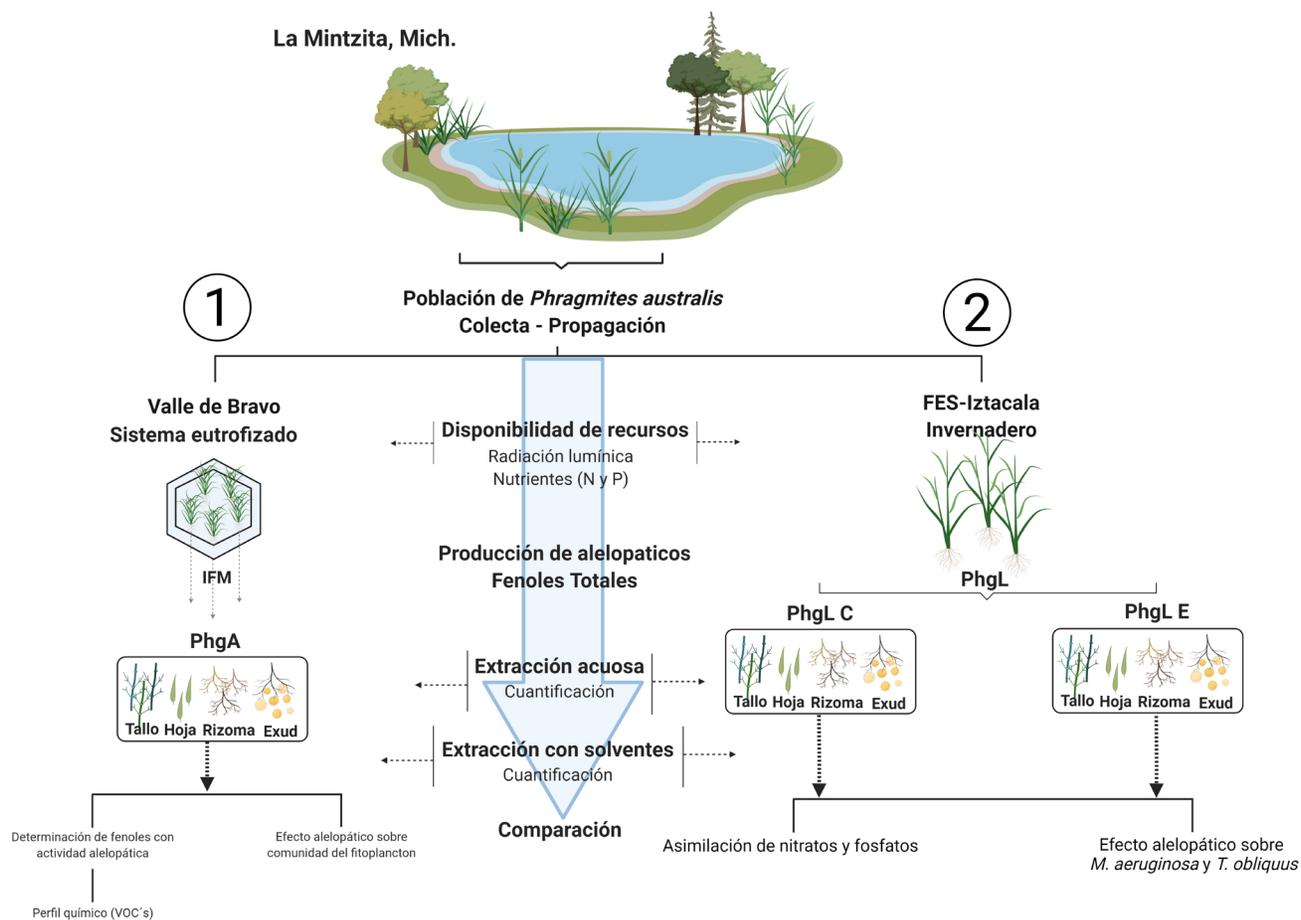


Figura 11. Esquema de diseño experimental.

1. A partir de la propagación de *P. australis* las plantas obtenidas fueron divididas en dos secciones, una de ellas creció bajo condiciones ambientales (PhgA) dentro de una plataforma sobre el embalse de Valle de Bravo como Isla Flotante con Macrofitas (IFM). En estas plantas se evaluó la presencia de los fenoles totales y fenoles con actividad alelopática (ácido cumárico, ácido gálico, ácido catequínico, ácido benzoico, ácido ferúlico y ácido vanílico), así como la composición de compuestos orgánicos volátiles (VOCs). El efecto alelopático fue evaluado sobre especies del fitoplancton y de forma paralela se realizó una evaluación de los variables fisicoquímicas del agua asociados a la presencia de las cianobacterias.

2. La otra sección de plantas creció bajo condiciones de laboratorio (PghL) para evaluar el efecto de la limitación de nitrógeno y fósforo sobre la producción de fenoles totales. Se llevaron a cabo dos grupos experimentales, en el primero PghL creció en concentraciones óptimas de estos nutrientes, por lo que se consideró como el grupo control (PghL C). En el segundo grupo, PghL estuvo sometida a limitación de estos nutrientes e irradiación luminosa, lo que se consideró como una condición de estrés (PghL E).

En PghL C se evaluó fenoles totales, fenoles con actividad alelopática y su efecto alelopático sobre la cianobacteria *M. aeruginosa* y el alga *T. obliquus*, mientras que en PghL E, se realizaron las mismas evaluaciones, excepto el efecto alelopático.

5.2.2 *Phragmites australis* bajo condiciones de crecimiento ambiental

El segundo lote con un número aproximado de 400 plantas de *Phragmites* se colocó en el modelo IFM en el embalse de Valle de Bravo para su crecimiento bajo condiciones ambientales. Después de seis meses de aclimatación de las plantas de *P. australis* en condiciones de crecimiento ambiental (en adelante como PhgA) en la IFM, se seleccionaron de una recolecta 3 ejemplares, cada uno con una talla entre 2.0 y 2.5 m, las cuales fueron secadas y fraccionadas en sus órganos vegetales para determinar su contenido de FT en cada una de sus estructuras vegetales. Se consideró como un factor de estrés y que posiblemente influyera en un incremento de FT a la exposición ambiental de *P. australis* con recurrente presencia de floraciones de cianobacterias (Figura 12).

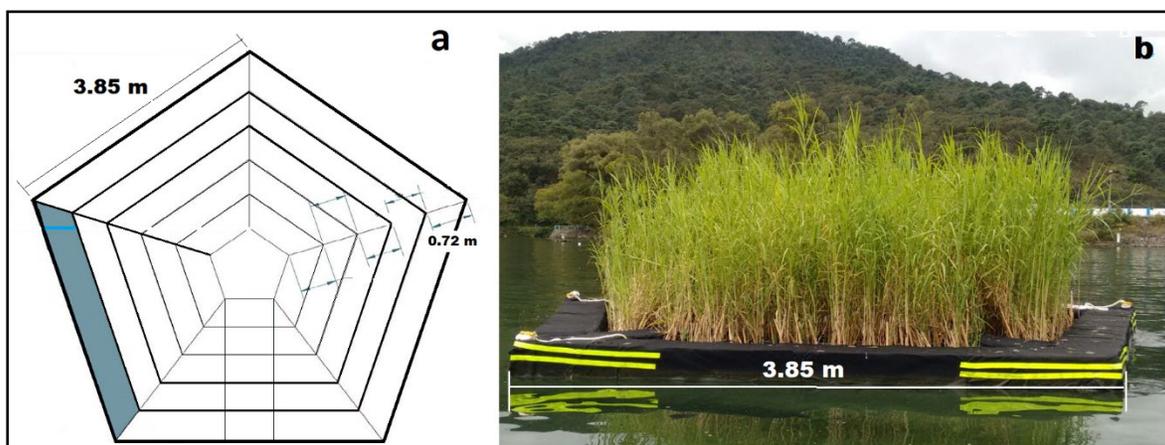


Figura 12. Diseño de la estructura de isla flotante con macrofita. La zona marcada y las flechas indican la sección de la canaleta en donde las macrofitas fueron plantadas (a). Modelo de isla flotante en el embalse de Valle de Bravo (b).

5.3 Obtención de extractos

5.3.1 Extractos acuosos

A partir de los ejemplares de *P. australis* bajo las tres condiciones de crecimiento, se obtuvieron extractos acuosos para la cuantificación de FT. Se pesaron 5 g de biomasa en peso seco (PS) de cada órgano vegetal como hoja, tallo y rizoma por cada una de las plantas, los cuales fueron sometidos a 12 h de maceración en 100 mL de agua tipo HPLC (Sigma-Aldrich 34877); la biomasa se procesó por maceración consecutiva de tres ciclos, recambiando el agua en cada uno. Posteriormente, la mezcla fue filtrada usando una membrana de fibra de vidrio de 0.7 μm (Merck Millipore AP4004705) y finalmente la mezcla obtenida se liofilizó (Labcono, LYPH LOCK 4.5) para obtener un extracto sólido (Erhard y Gross 2006; Cao et al., 2008; Addisie y Medellín 2012; Harrison et al., 2017).

5.3.2 Extractos acuosos / extractos orgánicos

En el caso de los exudados que libera la planta al agua, tanto para PhgL (muestra de agua del vaso de precipitado de vidrio en el cual se realizó el ensayo experimental) como para PhgA (muestra de agua contenida en tres canaletas que forman parte de la estructura de la isla y en las cuales están plantadas las macrofitas) (Figura 12), se utilizaron 500 mL de muestra, la cual fue filtrada en papel filtro Whatman (#1) y después por una membrana de 0.45 μm (HNWP) para obtener una muestra libre de células y de otros sólidos suspendidos. La muestra fue sometida a extracción líquido-líquido utilizando acetato de etilo (AcOEt) como disolvente de extracción, utilizando 500 mL x 3. El extracto fue concentrado en un rotavapor, así como la recuperación del solvente. El extracto fue secado mediante cámara de vacío, por lo que no fue liofilizado debido a la presencia de trazas del AcOEt y no alcanzar el punto de congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cao et al., 2008; Nakai et al., 2012; Březinová y Vymazal 2018).

De forma simultánea en otras tres muestras de agua de 500 mL se probó la extracción con resina polimérica Amberlita XAD-4 (Sigma-Aldrich XAD4) y con AcOEt como solvente de recuperación (la resina fue previamente activada con metanol). Este proceso con la resina se utilizó como segundo recurso para la extracción de FT, en caso de no obtener suficientes fenoles a partir de las muestras que se procesaron únicamente con AcOEt. Para la extracción de los exudados, cada muestra acuosa se puso en contacto con 200 g de resina por cada 500 mL de muestra, después de 2 h se separó la resina del agua y se recuperaron los exudados de la resina usando 300 mL de AcOEt, este procedimiento fue repetido tres veces y el extracto obtenido fue concentrado en un rotavapor (Březinová y Vymazal 2018; Khalaf et al., 2019).

5.3.3 Extractos orgánicos con disolventes de diferente polaridad

Para incrementar la extracción de FT con potencial alelopático en *Phragmites*, se utilizaron tres solventes orgánicos en cada una de las estructuras vegetales, metanol (MeOH), AcOEt y diclorometano (DCM). Se utilizó el procedimiento de extracción mencionado en el inciso 5.3.2. Con base en los resultados obtenidos en la cuantificación de FT, se seleccionó sólo como disolvente de extracción el disolvente que permitió obtener una mayor concentración de FT. Este proceso tuvo la finalidad de incrementar la cantidad de extractos, para realizar los análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) e identificar la presencia de los seis ácidos fenólicos propuestos (Březinová y Vymazal 2018; Khalaf et al., 2019).

5.4 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

La concentración de FT en los extractos derivados de cada uno de los órganos vegetales de *Phragmites*, obtenidos tanto por extracción acuosa como con disolvente, fue determinada utilizando 2 mg de cada extracto y 0.2 mg del extracto de los exudados. La medición de la concentración se realizó espectrofotométricamente de acuerdo con el método colorimétrico Folin-Ciocalteu (Slinkard y Singleton 1977; Sánchez-Rangel et al., 2013). Como estándar de FT se utilizó el ácido gálico (Sigma-Aldrich G7384) y los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (eq. AG mg/g PS).

5.5 Determinación de la presencia de fenoles con potencial alelopático

5.5.1 Identificación por cromatografía en capa fina

Para determinar la presencia de ácidos fenólicos asociados al efecto alelopático en macrofitas, en primer lugar, los extractos acuosos y metanólicos derivados de los órganos vegetales de *Phragmites* fueron analizados mediante cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatographic, TLC). Como referencias se utilizaron seis estándares (Sigma-Aldrich): ácido cumárico (CC9008), ácido gálico (G7384), ácido catequínico (C1251), ácido benzoico (242381), ácido ferúlico (128708) y ácido vanílico (94770). Las muestras se prepararon pesando 2 mg de cada estándar o extracto y fueron re-suspendidos en MeOH y DCM-MeOH 95:5, respectivamente. Una alícuota de cada muestra fue cargada a una placa de TLC (2.5 x 5 o 5.0 x 10.0 cm). Los sistemas de elución utilizados fueron DCM y MeOH (95:5 y 98:2 v/v) (Březinová y Vymazal 2018; Khalaf et al., 2019).

5.5.2 Identificación por espectrometría de masas

En segundo lugar, la identificación de los fenoles presentes en los extractos de *Phragmites*, se realizó utilizando la técnica de Espectrometría de masas con análisis directo en tiempo real (Mass Spectrometry - Direct Analysis in Real Time, MS-DART). De manera adicional, los seis estándares fenólicos utilizados como referencia en TLC fueron analizados para determinar la pureza de cada uno de ellos de acuerdo con el proveedor, así como para obtener su registro y comparar con las muestras de los extractos. Todas las muestras fueron pesadas y disueltas bajo las mismas condiciones que las empleadas para TLC,

posteriormente fueron sometidas a análisis por MS-DART (JEOL AccuTOF JMS-T100LC, Peabody, MA, US) (Bajpai et al., 2018).

5.5.3 Identificación por cromatografía líquida de alta eficacia

Por último, la identificación de los fenoles presentes en los extractos de *Phragmites*, se realizó utilizando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). De nueva cuenta las muestras preparadas bajo las mismas condiciones que las empleadas para TLC y MS. El análisis HPLC de ácidos fenólicos se realizó en un sistema LC de resolución rápida Agilent (LC QTOF, Agilent 6545, Santa Clara, CA). La columna utilizada fue de fase inversa Zorbax Eclipse XDB-C 18 de 2.1 $\mu\text{m} \times 100 \text{ mm}$, 2.7 μm (Agilent Technologies, EE. UU.). Para el análisis se utilizó una elución en gradiente lineal, con las dos fases móviles compuestas por ácido fórmico al 1% en agua/acetonitrilo 90:10 v/v (fase A) y acetonitrilo (fase B) utilizando el siguiente gradiente: 0-20 min, gradiente lineal de 0% B a 40% B; 20-25 min, gradiente lineal de 40% B a 60% B; 25,10-35 min, gradiente lineal de 100% B a 100% B y 35,10-40 min, isocrático de 0% B. La temperatura de la columna se fijó en 25° C. El volumen de inyección fue de 20 μL y la velocidad de flujo se fijó en 1.0 mL min^{-1} (Uddin et al., 2014; Othman et al., 2020).

5.6 Determinación del perfil químico de los compuestos orgánicos volátiles presentes en *Phragmites australis*

La determinación del perfil químico de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs: ácido cumárico, ácido gálico, ácido catequínico, ácido benzoico, ácido ferúlico y ácido vanílico) presentes en *Phragmites*, se llevó a cabo empleando microextracción en fase sólida y análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (Solid Phase Microextraction, SPME - Gas Chromatography - Mass Spectrometry, MS como SPME-GC-MS). Para el análisis, se utilizaron 3 g de biomasa fresca de tallo y de hojas, obtenida a partir de la mezcla de tres ejemplares, las muestras se colocaron en viales de microextracción en fase sólida (SPME) de 40 ml de capacidad, con un orificio-tapón de polipropileno y PTFE / silicon septa, que contenía 15 ml de agua con cloruro de sodio al 10 % (v/v). Los VOCs se obtuvieron por headspace (HS)-SPME con una fibra DVB / Carboxen / PDMS (2 cm, 50/30 μ m; Supelco, Bellefonte, PA). La fibra se acondicionó antes de su uso durante 40 min a 40 ° C, posteriormente, se expuso a los viales en HS durante 20 min. Después, de la adsorción de los VOCs, la fibra se insertó en la entrada de un equipo de cromatografía de gases, Agilent serie 6890 N (Agilent Technology, Palo Alto, CA). Este equipo se acopló a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo LECO (MS-TOF; Leco Corporation, St Joseph, MI) para identificar a los VOCs mediante ionización por electrospray (ESI-MS) (Hossain et al., 2010; Ando et al., 2015).

5.5 Evaluación de la inhibición de los extractos acuosos de *Phragmites australis* sobre *Microcystis aeruginosa* y *Tetrademus obliquus*

Para llevar a cabo la evaluación del efecto alelopático de los extractos acuosos de PhgL sobre el crecimiento de la cianobacteria *M. aeruginosa* y la microalga *T. obliquus*, ambas especies de fitoplancton se cultivaron por separado y por triplicado en matraces de 125 mL con un volumen de 25 ml de medio Z8. La densidad celular inicial de ambas especies en los cultivos fue de 2×10^6 células mL⁻¹. Este experimento estuvo conformado por un cultivo control de cada una de las especies y dos concentraciones (10 y 20 mg) del extracto acuoso de hoja, tallo, rizoma y exudados. Las densidades celulares de *M. aeruginosa* y *T. obliquus* se estimaron por separado y triplicado, usando un hemocitómetro (Boeco, BOE 01) al día 0, 2 y 4, previa fijación de las muestras en Lugol al 20%. Cuando se realizó el recuento celular para determinar el efecto de los extractos y compararlo con el número de células de los cultivos control, se observó que la disminución de los organismos por debajo del inóculo celular en el día 0 se debió a la fragmentación y aglomeración de las células, de modo que los fragmentos celulares no se consideraron en el recuento para los resultados (Stevenson et al., 1996).

5.6 Evaluación del potencial alelopático de *Phragmites australis* sobre especies del fitoplancton del embalse de Valle de Bravo

La evaluación del potencial alelopático de *Phragmites* en un sistema natural se realizó con la intención de evaluar su capacidad de fitorremediación, relacionado a la mejoría de la

calidad del agua, y de acuerdo con la hipótesis planteada, como consecuencia de la modificación del medio acuoso (reducción de nutrientes o por la presencia de FT como parte de los exudados liberados), resultando en una diferente dinámica de las poblaciones de cianobacterias (incluyendo especies potencialmente tóxicas) y su disminución.

El modelo de IFM se diseñó en forma pentagonal de 4.5 m por lado y una apotema de 3.85 m que parte de la zona central, cubriendo una superficie de 43.31 m². La estructura de soporte se construyó con perfil tubular galvanizado con sistema de flotación a base de poliestireno expandido y revestimiento de poli-aluminio y geomembrana (Pavlineri et al., 2017) (Figura 2). En la IFM (19 ° 12'46 "N, 100 ° 10'74" O) se colocaron alrededor de 400 plantas de *P. australis*, haplotipo I y se utilizó como sustrato en las canaletas de la isla, fibra de coco triturada. Dado el gran tamaño del embalse, el estudio se realizó en el área de toma de agua, donde se colocó el Control (19 ° 12'50 "N, 100 ° 10'74" O) con una boya sin plantas, por lo que el tratamiento aplicado para la mejora en la calidad del agua y disminución de la presencia de cianobacterias fue el modelo de IFM (Figura 12).

El análisis de las variables de la calidad del agua en los puntos elegidos se realizó de forma vertical según la posición de la toma de agua que extrae el agua de esta zona para enviarla a una planta de tratamiento de agua potable. El estudio se llevó a cabo durante un período de 24 meses, que se dividió en dos ciclos anuales, denominados C-I y C-II. Cada ciclo consideró tanto la temporada de secas (Dry Season, DS) como la temporada de lluvias (Rainy Season, RS), que son las dos estaciones climáticas en las regiones tropicales y subtropicales. El primer ciclo anual (C-I), DS fue de octubre de 2016 a marzo de 2017 y RS de abril a septiembre de 2017. Para el segundo ciclo anual (C-II), DS fue de octubre de 2017 a marzo de 2018 y RS fue de abril a septiembre 2018.

Las mediciones de las variables fisicoquímicas del agua y la toma de muestras *in situ* se realizaron a 1 y 2 m de profundidad, considerando las variaciones en la columna de agua se promediaron los valores obtenidos para el análisis estadístico. Estas mediciones se realizaron de 10:00 a.m. a 12:00 p.m. el día 10 de cada mes. En los sitios control e IFM se realizaron muestreos que incluyeron mediciones de pH, temperatura del agua (potenciómetro portátil, Hanna HI 9126) y transparencia con disco Secchi. En el área de estudio, se tomaron muestras acuosas de 4.4 L utilizando una botella Van Dorn horizontal (2.2 L, Watermark), las muestras se depositaron en botellas de vidrio ámbar (1 L) y se transportaron en refrigeración al laboratorio donde se analizaron los nitratos (NO_3^-), los fosfatos (PO_4^{3-}) y la turbidez mediante un método colorimétrico (Kit YSI 9500 con sistema de reactivos: Nitratest y Fosfato LR) basado en Métodos Estándar (APHA, Baird et al., 2012).

La densidad celular de los grupos de algas del fitoplancton se cuantificó directamente a partir de las muestras de agua, utilizando el método de Utermöl (Wetzel y Likens, 2013), y cámaras de sedimentación de 50 mL, cuantificadas en un microscopio óptico invertido D-Carl Zeiss con contraste de fases. Los resultados se expresaron como células mL^{-1} . La identificación taxonómica se realizó con base en Huber-Pestalozzi (1962, 1968), Prescott (1962), Komárek (1983), Tell y Conforti (1986), Popovsky y Pfiester (1990), Round et al. (1990), Comas (1996), Komárek y Anagnostidis (1999), Komárek (2003) y Cronberg y Annadotter (2006). La abundancia de cada especie se determinó según Dash y Mahanta (1993) como Abundancia relativa = (Número de células por especie / Número total de células) x 100. El biovolumen para el grupo de las cianobacterias se obtuvo con base en Sun y Liu (2003).

La determinación de variables biológicas como cianobacterias a través de la cuantificación de ficocianina (PC) se realizó mediante análisis de fluorescencia según el procedimiento SOP 3 del Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin (Yéprémian et al., 2016) utilizando un módulo de fluorescencia Trilogy Turner Designs 7200 y un filtro Phycocyanin freshwater (7200-044).

Para el análisis de microcistina extracelular (E-MC) e intracelular (I-MC), la biomasa de las muestras ambientales se concentró por centrifugación (13,000 rpm, 20 min). El sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana de nailon de 0.45 µm de tamaño de poro (HNWP04700, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, EE. UU.) para obtener una alícuota libre de células y cuantificar la E-MC. El pellet se sometió al proceso de congelación-sonicación para obtener un extracto acuoso de la toxina intracelular (Triantis et al., 2010; Merel et al., 2013). Las microcistinas se cuantificaron mediante kit inmunológico basado en la prueba ELISA (QuantiPlate™, EnviroLogix™). Los resultados se reportaron como equivalentes de microcistina-LR. Todas las mediciones de las variables fisicoquímicas del agua *in situ* como los análisis de laboratorio se realizaron por triplicado.

5.7 Manejo de Datos

En la macrofita de *Phragmites* crecida en laboratorio como PhgL C y PhgL E, se analizó la relación entre la asimilación de nitrógeno y fósforo (como nitrato y fosfato, respectivamente) con relación a la disponibilidad de ambos nutrientes. Con estos resultados se aplicó el modelo cinético enzimático de Michaelis-Menten, de acuerdo con la ecuación de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S}$$

Donde: μ es la tasa específica de consumo del nutriente (nitrato o fosfato), μ_{\max} es la tasa específica de consumo, K_s es la constante de saturación media para consumo y S es la concentración de sustrato o nutriente (Reynolds 2006).

5.8 Análisis estadísticos

Para comparar las diferencias en *Phragmites* de la obtención de FT entre las plantas, órganos vegetales y extractos obtenidos mediante disolventes orgánicos en la condición de crecimiento ambiental y en laboratorio, se aplicó una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas con un análisis de medias post hoc, asimismo se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni con un nivel de significancia con alfa de 0.05. Con este mismo método estadístico se realizaron las comparaciones del efecto de inhibición de *P. australis* sobre el conteo celular entre *M. aeruginosa* y *T. obliquus*

Para los datos donde *Phragmites* fue evaluada en condiciones ambientales como PhgA, se calculó el valor medio de cada una de las variables fisicoquímicas y biológicas por temporada en C-I y C-II. Se aplicó una prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas con una prueba de comparación múltiple de Dunnett, con alfa de 0.05 para determinar las diferencias entre el sitio control y la IFM. Las relaciones entre las variables fisicoquímicas y el biovolumen de las cinco especies de cianobacterias dominantes se calcularon mediante

un análisis de correspondencia canónica parcial (pCCA; Canoco para Windows 4.5) por estación y sitio, tomando el período de tiempo (meses) como covariable.

6. RESULTADOS

6.1 Porcentaje de rendimiento en la obtención de extractos en *Phragmites australis*

El rendimiento en la obtención de extractos acuosos en *Phragmites* mostró que PhgA obtuvo el mayor porcentaje de rendimiento en hoja donde osciló entre 7.7 y 8.9%. En la condición PhgL el porcentaje de rendimiento fue similar entre PhgL C y PhgL E, donde la hoja fue también el tejido con más rendimiento (5.1 a 6.7%) sobre los otros tejidos (Cuadro 2).

En la obtención de extractos utilizando solventes orgánicos, el disolvente MeOH en hoja mostró los mayores rendimientos, sobre los otros (AcOEt y DCM), principalmente en la condición de crecimiento PhgA en un rango aproximado de 18 a 23%. Entre los disolventes AcOEt y DCM los rendimientos fueron semejantes, en un rango cercano de 15 a 19%. En el caso de la obtención de los exudados con la amberlita A-XAD4 se tuvo un rendimiento ligeramente por encima del disolvente AcOEt, donde también la condición PhgA sobresalió de PhgL C y PhgL E (3.1, 2.1 y 2.2%, respectivamente) (Cuadro 3).

Cuadro 2. Porcentaje de rendimiento en la obtención de extractos acuosos (Ext. Acuo.) en *P. australis*. Datos a partir de 5 g de biomasa en peso para cada órgano vegetal como hoja (H), tallo (T) y rizoma (R) bajo las tres condiciones de crecimiento como ambiental (PhgA) y en laboratorio en condiciones Control (PhgL) C y de Estrés (PhgL E). Porcentaje de rendimiento como %R.

| %R | PhgA | | | | | | | | |
|----------|------|-----|-----|--------|-----|-----|--------|-----|-----|
| | PhgA | | | PhgL C | | | PhgL E | | |
| | H | T | R | H | T | R | H | T | R |
| Planta 1 | 7.7 | 6.5 | 6.2 | 6.7 | 4.9 | 4.8 | 6.8 | 5.6 | 5.2 |
| Planta 2 | 8.6 | 6.2 | 5.6 | 5.5 | 5.1 | 4.6 | 5.8 | 5.1 | 4.3 |
| Planta 3 | 8.9 | 5.8 | 6.0 | 5.1 | 4.5 | 4.9 | 6.0 | 4.6 | 4.9 |

Cuadro 3. Porcentaje de rendimiento (%R) en la obtención de extractos acuosos y extractos orgánicos en *P. australis*. Valores a partir de 20 g de biomasa en peso seco de cada órgano vegetal como hoja (H), tallo (T), rizoma (R) y exudado (E) bajo las tres condiciones de crecimiento como ambiental (PhgA) y en laboratorio en condiciones Control (PhgL C) y de Estrés (PhgL E).

| %R | PhgL | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|------|------|------|-----|--------|------|------|-----|--------|------|------|-----|
| | PhgA | | | | PhgL C | | | | PhgL E | | | |
| | H | T | R | E | H | T | R | E | H | T | R | E |
| H₂O | 9.2 | 6.8 | 6.5 | - | 8.6 | 6.4 | 6.4 | - | 8.1 | 6.0 | 5.9 | - |
| MeOH | 23.4 | 19.9 | 18.1 | - | 19.7 | 19.2 | 17.5 | - | 18.6 | 18.6 | 17.3 | - |
| AcOEt | 19.4 | 15.6 | 17.5 | 2.7 | 15.5 | 16.2 | 17.8 | 1.9 | 14.7 | 16.1 | 17.0 | 1.9 |
| DCM | 18.7 | 16.4 | 17.6 | - | 18.4 | 15.7 | 17.1 | - | 17.6 | 15.5 | 17.0 | - |
| A-XAD4 | - | - | - | 3.1 | - | - | - | 2.1 | - | - | - | 2.2 |

6.2 Fenoles totales en *Phragmites australis*

6.2.1 Fenoles totales en extractos acuosos de *Phragmites australis*

La macrofitas *P. australis* crecida en laboratorio bajo condiciones óptimas de crecimiento como PhgL C, presentó la menor cantidad de FT de todo el estudio, cuyos valores máximos fueron: en hoja: 71.0 ± 1.3 mg/g PS en la Planta 2, tallo: 16.8 ± 1.4 mg/g PS en la Planta 2 y rizoma: 13.2 ± 2.1 mg/g PS en la Planta 2 (Figura 13a). Se encontraron diferencias significativas en FT entre la hoja con respecto al tallo y rizoma ($p < 0.05$), en las tres plantas (Cuadro 4).

En condiciones limitantes de nitrógeno y fósforo *P. australis* como PhgL E mostró valores máximos de FT en hoja de 75.3 mg/g PS en la Planta 1 y 3, en tallo fue de 22.6 ± 2.1 mg/g PS en la Planta 3 y en el rizoma de 15.1 ± 2.0 mg/g PS en la Planta 1 (Figura 13b). Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de FT de la hoja, el tallo y el rizoma.

En la macrofita *P. australis* bajo condiciones de crecimiento ambiental (PhgA) se observó que la hoja fue el tejido vegetal que contiene la mayor cantidad de FT con respecto al tallo y rizoma. El valor más alto registrado fue de 110.8 ± 3.4 mg/g PS en la Planta 3. En el tallo, el valor de FT máximo alcanzado fue de 41.4 ± 2.6 mg/g PS, también en la Planta 3. El rizoma mostró el mayor registro de FT con 23.0 ± 1.9 mg/g PS en la Planta 2. En PhgA se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en la concentración de FT entre cada uno de los órganos en las tres plantas analizadas (Figura 13c).

Al comparar la concentración de FT producidos por *Phragmites* en cada una de las tres condiciones de crecimiento con la Prueba de comparación múltiple Tukey, se encontró diferencia significativa en la hoja entre PhgA con PhgL C y PhgL E, mientras que la diferencia de los FT en el tallo fue entre PhgA y PhgL C. El rizoma no mostró diferencia significativa entre las tres condiciones de crecimiento (Figura 13d). El análisis ANOVA de dos vías mostró que existe diferencia significativa en la concentración de FT entre las tres condiciones de crecimiento a la que se sometió *Phragmites* (Cuadro 5), de modo que cada una de ellas, influye sobre la cantidad de FT producidos en la estructura vegetal.

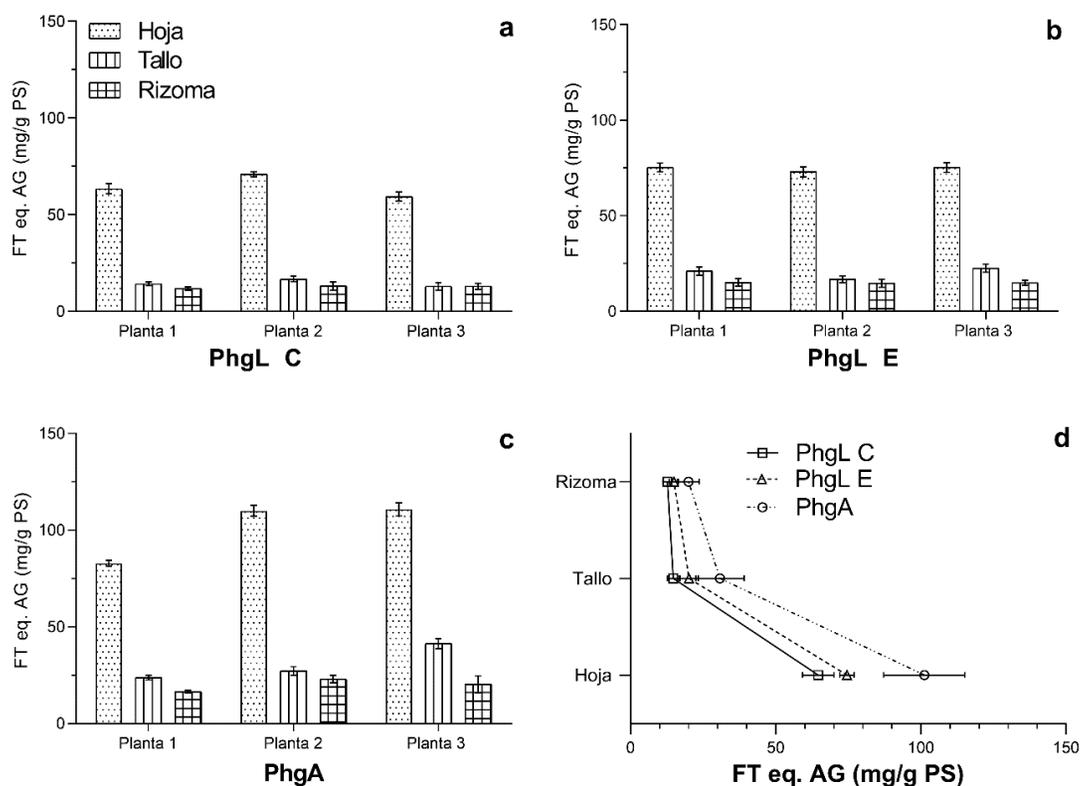


Figura 13. Cuantificación de la concentración de FT en *Phragmites*, considerando en cada ejemplar su contenido de acuerdo con su estructura vegetal en las tres condiciones de crecimiento evaluadas, PhgA, PhgL C, PhgL E.

Cuadro 4. Registro de la concentración de FT y su comparación entre los órganos vegetales de la macrofitas *Phragmites* en las tres condiciones de crecimiento; ambiental (PhgA) y en laboratorio bajo condiciones óptimas de irradiación lumínica y nutrientes de nitrógeno y fósforo (PhgL C) y en exposición a estrés limitando estos factores (PhgL E). SS: Sum of Squares como suma de cuadrados, MS: Mean Square como media cuadrática, DF: degrees of freedom como grados de libertad.

| Cond. Crec. | Planta | Hoja | Tallo | Rizoma | ANOVA (Column Factor) | | | | |
|-------------|--------|--------------------------|----------------|----------------|-----------------------|-------|----|-------|--------|
| | | Media (mg/g PS) \pm DE | | | SS | MS | DF | F | p |
| PhgL C | 1 | 63.4 \pm 2.6 | 14.3 \pm 1.0 | 11.8 \pm 0.9 | 15570 | 7785 | 2 | 1811 | <0.001 |
| | 2 | 71.0 \pm 1.3 | 16.8 \pm 1.4 | 13.2 \pm 2.1 | | | | | |
| | 3 | 59.4 \pm 2.2 | 13.0 \pm 1.9 | 13.0 \pm 1.6 | | | | | |
| PhgL E | 1 | 75.3 \pm 2.3 | 21.1 \pm 2.1 | 15.2 \pm 2.0 | 19594 | 9797 | 2 | 819.6 | <0.001 |
| | 2 | 72.9 \pm 2.6 | 16.8 \pm 1.8 | 14.7 \pm 2.1 | | | | | |
| | 3 | 75.3 \pm 2.6 | 22.6 \pm 2.1 | 14.9 \pm 1.2 | | | | | |
| PhgA | 1 | 82.9 \pm 1.5 | 23.8 \pm 1.3 | 16.5 \pm 0.7 | 35019 | 17509 | 2 | 2961 | <0.001 |
| | 2 | 110.0 \pm 2.9 | 27.3 \pm 2.2 | 23.0 \pm 1.9 | | | | | |
| | 3 | 110.8 \pm 3.4 | 41.4 \pm 2.6 | 20.4 \pm 4.4 | | | | | |

Cuadro 5. Análisis comparativo ANOVA (dos vías, con medidas repetidas) del efecto de las tres condiciones de crecimiento (PhgL C, PhgL E y PhgA) en *P. australis* y sus órganos vegetales sobre la concentración de FT.

| | PhgL C | PhgL C | PhgL E | ANOVA (Interaction Factor) | | | | |
|---------------|--------------|------------|------------|----------------------------|-------|----|-----|----------|
| | vs PhgL E | Vs PhgA | vs PhgA | SS | MS | DF | F | <i>p</i> |
| Hoja | 0.0826 | <0.001 | <0.001 | | | | | |
| Tallo | 0.3939 | 0.008 | 0.062 | 734.6 | 183.7 | 4 | 7.9 | 0.007 |
| Rizoma | 0.836 | 0.214 | 0.446 | | | | | |

6.2.2 Fenoles totales en extractos orgánicos de *Phragmites australis*

La obtención de FT a partir de disolventes orgánicos en PhgL C, mostró que la hoja registró mayor concentración cuando estos fueron extraídos con metanol (MeOH), con un valor de 189.1 ± 26.4 mg/g PS, seguido de la extracción con acetato de etilo (AcOEt) con 172.2 ± 9.6 mg/g PS y el diclorometano (DCM) en menor cantidad con 151.7 ± 12.7 mg/g PS. La extracción de FT en las estructuras vegetales, mostraron una tendencia a ser mayores en el tallo que en el rizoma en los tres solventes utilizados (Figura 14). Se encontraron diferencias significativas de FT entre las tres estructuras vegetales de la macrofita, excepto del tallo y el rizoma con MeOH (Cuadro 6).

La condición de crecimiento PhgL E mostró un incremento en la concentración de FT en la hoja de 46 % (275.3 ± 21.6 mg/g PS) al ser extraídos con MeOH, 38% (209.5 ± 6.3 mg/g PS) usando DCM y del 40 % (241.9 ± 9.3 mg/g PS) con AcOEt, comparado con PhgL C. Se observó de igual forma una tendencia de mayor concentración al utilizar AcOEt que en DCM en el tallo y rizoma, respectivamente (Figura 14). Las diferencias significativas ($p < 0.05$) fueron observadas entre la hoja y el tallo con respecto al rizoma en los tres disolventes de extracción (Cuadro 6).

En PhgA la extracción de FT en la hoja mediante MeOH, DCM y AcOEt incremento en un 69 % (319.5 ± 17.6 mg/g PS), 61 % (243.5 ± 11.4 mg/g PS) y 38 % (238.3 ± 5.8 mg/g PS) respectivamente, en comparación con Phg C. Los valores del tallo fueron de 136.2 ± 12.6 mg/g PS y 105.1 ± 11.3 mg/g PS, para el rizoma fueron de 139.6 ± 10.0 mg/g PS y 116.3 ± 20.1 mg/g PS para AcOEt y DCM, respectivamente (Figura 14). Como en las condiciones de crecimiento anteriores, las diferencias fueron de la hoja con respecto al tallo y rizoma para los tres solventes (Cuadro 6).

De acuerdo con los resultados la extracción de FT empleando estos disolventes orgánicos, se observó una mayor eficiencia al utilizar el MeOH, seguido por AcOEt y DCM. La mayor diferencia significativa en la concentración de FT fue entre la condición de crecimiento PhgL C y PhgA (Cuadro 7). También se observó que la concentración de FT en las estructuras vegetales es consistente con la distribución encontrada en los extractos acuosos, donde la hoja es el órgano que contiene la mayor cantidad de estos compuestos, mientras que en menor concentración fue el tallo y el rizoma, ambos con valores semejantes.

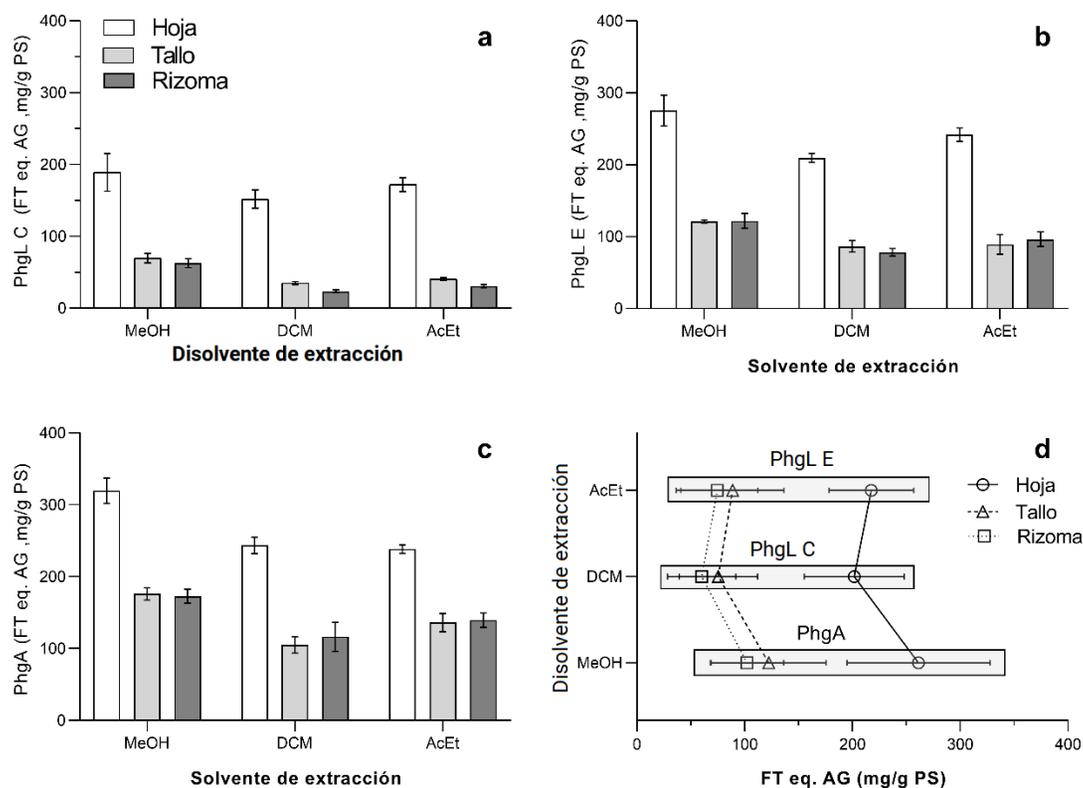


Figura 14. Cuantificación de la concentración de FT en *P. australis* en las tres condiciones de crecimiento, PhgL C, PhgL E y PhgA. Se utilizó metanol (MeOH), acetato de etilo (AcOEt) y diclorometano (DCM) como disolvente de extracción utilizado para cada una de las estructuras vegetales de la macrofita.

Cuadro 6. Cuantificación de la concentración de FT en los tres disolventes de extracción utilizados en la macrofita *P. australis*. Asimismo su comparación para determinar el efecto de cada uno de los disolventes sobre la eficiencia de extracción en los diferentes órganos de la macrofita.

| Cond. Crec. | Disolvente | Hoja | Tallo | Rizoma | ANOVA (Row Factor) | | | | |
|-------------|------------|----------------------|--------------|--------------|--------------------|-------|----|-------|--------|
| | | Media (mg/g PS) ± DE | | | SS | MS | DF | F | p |
| PhgL C | MeOH | 189.1 ± 26.4 | 69.7 ± 6.6 | 62.7 ± 6.2 | 6507 | 3253 | 2 | 55.83 | <0.001 |
| | DCM | 151.7 ± 12.7 | 35.0 ± 2.3 | 23.6 ± 2.0 | | | | | |
| | AcOEt | 172.2 ± 9.6 | 40.6 ± 1.9 | 30.8 ± 2.2 | | | | | |
| PhgL E | MeOH | 275.3 ± 21.6 | 121.1 ± 2.1 | 121.8 ± 10.3 | 10593 | 5297 | 2 | 50.76 | <0.001 |
| | DCM | 209.5 ± 6.3 | 86.5 ± 8.1 | 78.3 ± 5.3 | | | | | |
| | AcOEt | 241.9 ± 9.3 | 89.3 ± 13.6 | 96.3 ± 10.1 | | | | | |
| PhgA | MeOH | 319.5 ± 17.6 | 176.0 ± 8.3 | 172.7 ± 9.7 | 22492 | 11246 | 2 | 53.82 | <0.001 |
| | DCM | 243.5 ± 11.4 | 105.1 ± 11.3 | 116.3 ± 20.0 | | | | | |
| | AcOEt | 238.3 ± 5.8 | 136.2 ± 12.6 | 139.6 ± 10.0 | | | | | |

Cuadro 7. Análisis comparativo ANOVA (dos vías, con medidas repetidas) entre los tres tratamientos de crecimiento en *P. australis*, con respecto al disolvente utilizado en las extracciones para determinar su eficiencia en la obtención de FT.

| Hoja | | | | ANOVA (Row Factor) | | | | |
|-------|---------------------|----------------------|----------------------|--------------------|------|----|-----|----------|
| | PhgL C vs PhgL E | PhgL C Vs PhgA | PhgL E vs PhgA | SS | MS | DF | F | <i>p</i> |
| MeOH | 0.158 | 0.006 | 0.315 | | | | | |
| DCM | 0.062 | 0.040 | 0.013 | 17221 | 8611 | 2 | 125 | 0.005 |
| AcOEt | <0.001 | 0.027 | 0.883 | | | | | |

6.2.3 Fenoles totales en exudados de *Phragmites australis*

La concentración de FT en los exudados de *Phragmites*, extraídos del agua, mostró que la condición de crecimiento PhgA presentó una mayor cantidad de estos compuestos en las tres muestras analizadas, tanto extraídos mediante el disolvente AcOEt (valor máximo de 44.5 ± 3.9 mg/g en la muestra 1) como los obtenidos por la resina A-XAD4 (valor máximo de 47.2 ± 1.0 mg/g, misma muestra). PhgL E y PhgL C registraron valores máximos de 38.5 ± 0.4 y 35.1 ± 1.6 mg/g en la muestra 2 para AcOEt, mientras que para A-XAD4 fueron de 41.6 ± 0.7 y 36.3 ± 0.6 mg/g, por lo que ambas condiciones de crecimiento fueron menores que la condición ambiental. Particularmente, PhgL C, mantuvo la tendencia de menor concentración de FT (Figura 15). No hubo diferencias significativas entre el método de extracción al utilizar el AcOEt o la resina amberlita A-XAD4 y la condición de crecimiento, por lo que la eficiencia en la obtención de FT fue estadísticamente la misma (Cuadro 8 y 9).

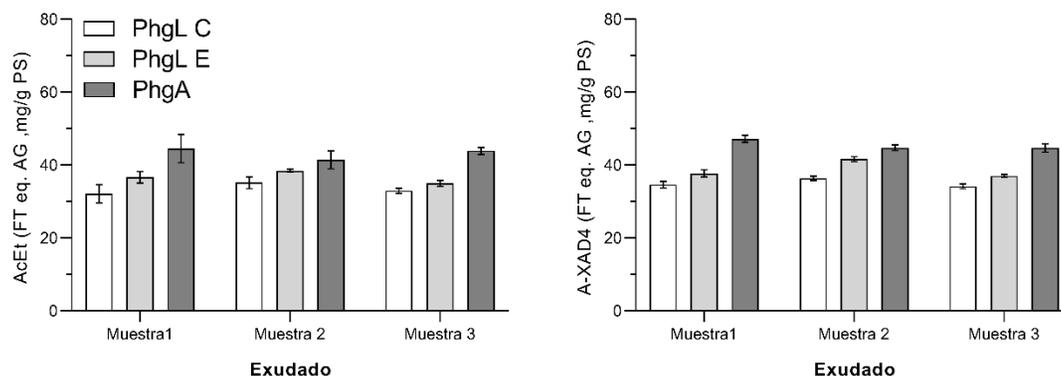


Figura 15. Cuantificación de la concentración de FT en los exudados liberados al medio acuoso por *P. australis*, en las tres condiciones de crecimiento, PhgL C, PhgL E y PhgA. Para la obtención de estos compuestos se utilizó una extracción líquido – líquido con AcOEt y líquido – sólido mediante el uso de la resina polimérica A-XAD4.

Cuadro 8. Registro de la concentración media de FT en los exudados de *P. australis*, en las tres condiciones de crecimiento, PhgL C, PhgL E y PhgA y su análisis comparativo del efecto de cada uno de los solventes (Row Factor) con la condición de crecimiento.

| Extracción con | Muestra | PhgL C | PhgL E | PhgA | ANOVA (Row Factor) | | | | |
|----------------|---------|--------------------------|----------------|----------------|--------------------|-------|----|-------|-------|
| | | Media (mg/g PS) \pm DE | | | SS | MS | DF | F | p |
| AcOEt | 1 | 32.1 \pm 2.5 | 36.7 \pm 1.6 | 44.5 \pm 3.9 | 5.296 | 2.648 | 2 | 0.81 | 0.439 |
| | 2 | 35.1 \pm 1.6 | 38.5 \pm 0.4 | 41.4 \pm 2.5 | | | | | |
| | 3 | 32.9 \pm 0.7 | 34.9 \pm 0.8 | 43.9 \pm 0.9 | | | | | |
| A-XAD4 | 1 | 34.6 \pm 0.9 | 37.7 \pm 0.9 | 47.2 \pm 1.0 | 23.47 | 11.74 | 2 | 20.19 | 0.051 |
| | 2 | 36.3 \pm 0.6 | 41.6 \pm 0.7 | 44.7 \pm 0.8 | | | | | |
| | 3 | 34.1 \pm 0.6 | 37.0 \pm 0.4 | 44.7 \pm 1.2 | | | | | |

Cuadro 9. Análisis comparativo ANOVA (dos vías, con medidas repetidas) entre el efecto de cada uno de los dos métodos de extracción de FT (Row Factor) a partir de los exudados y la condición de crecimiento a la que fue sometido *P. australis*.

| | PhgL C vs PhgL E | PhgL C vs PhgA | PhgL E vs PhgA | ANOVA (Row Factor) | | | | |
|--------|------------------|----------------|----------------|--------------------|-------|----|------|-------|
| | | | | SS | MS | DF | F | p |
| AcOEt | 0.121 | <0.001 | 0.005 | 17.81 | 17.81 | 2 | 7.43 | 0.053 |
| A-XAD4 | 0.076 | <0.001 | 0.004 | | | | | |

6.3 Asimilación de nutrientes y producción de fenoles totales en *Phragmites australis* en condiciones de crecimiento de laboratorio

En la macrofita de *Phragmites* crecida en laboratorio como PhgL C y PhgL E, se analizó la relación entre la asimilación de nitrógeno y fósforo (como nitrato y fosfato, respectivamente) consumido con respecto a la disponibilidad de ambos nutrientes, con los datos obtenidos y aplicado al modelo cinético enzimático de Michaelis-Menten, se obtuvo un consumo de nutrientes como nitratos (NaNO_3) y fosfatos (K_2HPO_4) en PhgL, se observó que la asimilación de cada uno de ellos bajo las dos condiciones PhgL C y PhgL E tiende a aumentar conforme a su disponibilidad, siguiendo una cinética de Michaelis-Menten.

En el caso de NaNO_3 , se registró que la condición de crecimiento PhgL E requirió 3.6 veces menos la concentración de nitratos (K_m : 0.005 mM L^{-1}) para alcanzar un 89% de la tasa de consumo (V_{max} : 0.168 mM L^{-1}) con respecto a la condición PhgL C (k_m : 0.018 mM L^{-1} y V_{max} : 0.188 mM L^{-1}) (Figura 16 a y b). Para K_2HPO_4 los resultados obtenidos mostraron que PhgL E requirió 3 veces menos la concentración de fosfatos (K_m : 0.201 mM L^{-1}), consiguiendo superar en un 19 % la tasa de consumo de este nutriente (V_{max} : 0.246 mM L^{-1}), con respecto a PhgL C (k_m : 0.612 mM L^{-1} y V_{max} : 0.213 mM L^{-1}) (Figura 16 c y d).

A pesar de que PhgL E mostró una mayor eficiencia en la asimilación de estos nutrientes con respecto a su disponibilidad ($V_{\text{max}}:K_m$), esta no consiguió superar significativamente la tasa de consumo (Cuadro 10), y que además, de acuerdo a los resultados en la producción de FT, no tuvo un incremento significativo entre ambas condiciones de crecimiento (Figura 16 e y f).

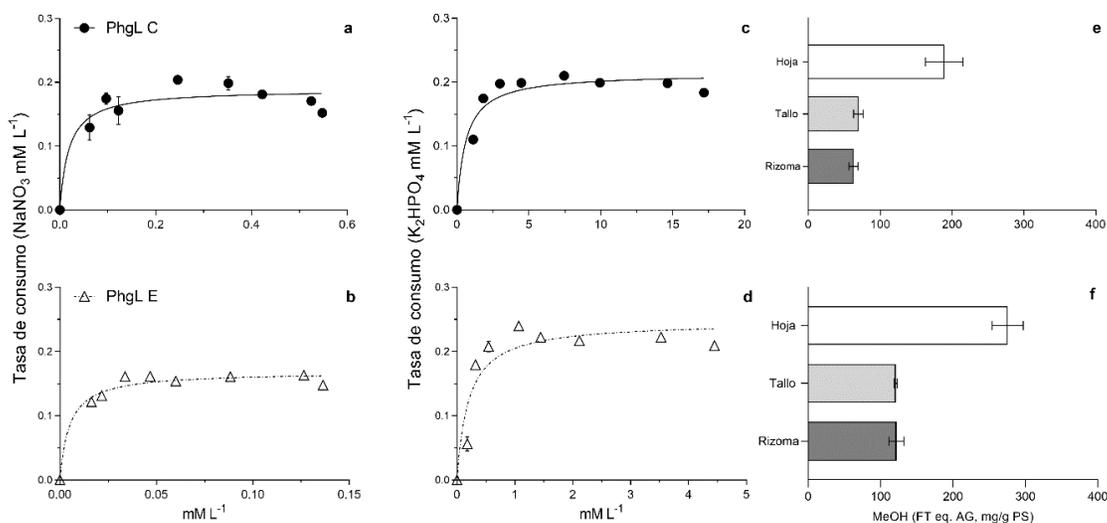


Figura 16. Tasa de consumo de nitrógeno y fósforo en *P. australis* en condición de crecimiento en laboratorio, PhgL C, PhgL E y su cuantificación de FT.

Cuadro 10. Cinética de asimilación de nitratos y fosfatos en *P. australis*.

| Nutriente | Cond. Crec. | km | Vmax | Vmax:km | R ² | p |
|-------------------------------|-------------|-------------------------|---------------|---------|----------------|-------|
| | | mM L ⁻¹ (DE) | | | | |
| NO ₃ ⁻ | PhgL C | 0.018 (0.001) | 0.188 (0.08) | 10.55 | 0.88 | 0.505 |
| | PhgL E | 0.005 (0.001) | 0.168 (0.04) | 34.00 | 0.97 | |
| PO ₄ ³⁻ | PhgL C | 0.612 (0.122) | 0.213 (0.06) | 0.34 | 0.94 | 0.807 |
| | PhgL E | 0.201 (0.048) | 0.246 (0.011) | 1.22 | 0.87 | |

6.4 Efecto alelopático de los extractos acuosos de *Phragmites australis* sobre el crecimiento de *Microcystis aeruginosa* y *Tetradesmus obliquus*

El efecto alelopático de PhgL C fue evaluado utilizando los extractos acuosos de cada una de las estructuras vegetales y los exudados obtenidos del medio acuoso, sobre dos especies del fitoplancton, *M. aeruginosa* y *T. obliquus* (Cuadro 11). Los resultados mostraron efecto del extracto acuoso de 10 mg sobre monocultivos de *Microcystis*, la hoja presentó un efecto

inhibidor significativo ($p < 0.05$) de 22% en el día 2 y de 24% para el día 4, con respecto al control, mientras que los tres extractos restantes no mostraron efecto (Figura 17a). En *Tetradismus* el efecto alelopático fue conseguido tanto por los extractos de las estructuras vegetales como por el exudado, en promedio el efecto alelopático fue del 57% al día 2 y 49% al día 4 en promedio un 55% ($p < 0.05$) en comparación con el control. Asimismo, los valores obtenidos con los extractos no mostraron un crecimiento lineal de incremento, por el contrario, el número celular durante los días del experimento fue menor al inóculo inicial, esto debido a que en la muestra analizada se observaron fragmentos celulares del alga que superaban en número a las células completas (Figura 17b).

Por otra parte, con la concentración probada de 20 mg de cada uno de los extractos, los resultados mostraron que sobre *Microcystis* los cuatro extractos tuvieron un efecto alelopático, siendo significativamente menores ($p < 0.05$) en un 17% al día 2 y 27% al día 4, con respecto al control (Figura 17c). Para *Tetradismus* en presencia con los extractos, se observó en promedio una inhibición significativa ($p < 0.05$) de 20% y de 57% al día 2 y 4, respectivamente, en comparación al registro del control (Figura 17d). Estos resultados del efecto alelopático de *Phragmites* sobre las especies del fitoplancton evaluadas, mostraron que *Tetradismus* fue más sensible que *Microcystis*. También se observó que, a mayor concentración del extracto aumentó el efecto de inhibición, particularmente al cuarto día de exposición al extracto (Publicación de resultados en revista indexada como ANEXO 1).

Cuadro 11. Evaluación del efecto alelopático de los extractos acuosos de las estructuras vegetales de *P. australis* sobre la densidad celular de *M. aeruginosa* y *T. obliquus*.

| Especie alga | Conc. Extracto (mg) | Día | Control | Hoja | Tallo | Rizoma | Exudado |
|----------------------|---------------------|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | | | | | | |
| <i>M. aeruginosa</i> | 10 | 0 | 2.0 ± 0.1 | 2.0 ± 0.1 | 2.0 ± 0.1 | 2.0 ± 0.1 | 2.0 ± 0.7 |
| | | 2 | 2.7 ± 0.1 | 2.1 ± 0.1 | 2.7 ± 0.1 | 2.6 ± 0.1 | 2.5 ± 0.2 |
| | | 4 | 3.3 ± 0.2 | 2.5 ± 0.2 | 3.3 ± 0.3 | 3.5 ± 0.1 | 3.3 ± 0.4 |
| | 20 | 0 | 1.9 ± 0.1 | 1.8 ± 0.2 | 1.8 ± 0.2 | 1.8 ± 0.1 | 1.9 ± 0.1 |
| | | 2 | 3.2 ± 0.2 | 2.5 ± 0.2 | 2.7 ± 0.1 | 2.8 ± 0.1 | 2.6 ± 0.1 |
| | | 4 | 4.7 ± 0.1 | 3.2 ± 0.2 | 3.7 ± 0.2 | 3.5 ± 0.1 | 3.4 ± 0.1 |
| <i>T. obliquus</i> | 10 | 0 | 2.0 ± 0.2 | 1.9 ± 0.1 | 2.0 ± 0.1 | 2.0 ± 0.1 | 2.0 ± 0.1 |
| | | 2 | 2.2 ± 0.1 | 1.1 ± 0.1 | 0.9 ± 0.1 | 0.9 ± 0.1 | 0.9 ± 0.1 |
| | | 4 | 2.3 ± 0.2 | 1.4 ± 0.1 | 1.2 ± 0.1 | 0.9 ± 0.2 | 1.2 ± 0.1 |
| | 20 | 0 | 1.9 ± 0.2 | 2.0 ± 0.1 | 1.8 ± 0.1 | 1.9 ± 0.1 | 2.0 ± 0.1 |
| | | 2 | 2.1 ± 0.1 | 1.7 ± 0.2 | 1.6 ± 0.1 | 1.7 ± 0.1 | 1.7 ± 0.2 |
| | | 4 | 2.9 ± 0.2 | 1.8 ± 0.2 | 1.6 ± 0.1 | 1.6 ± 0.1 | 1.6 ± 0.1 |

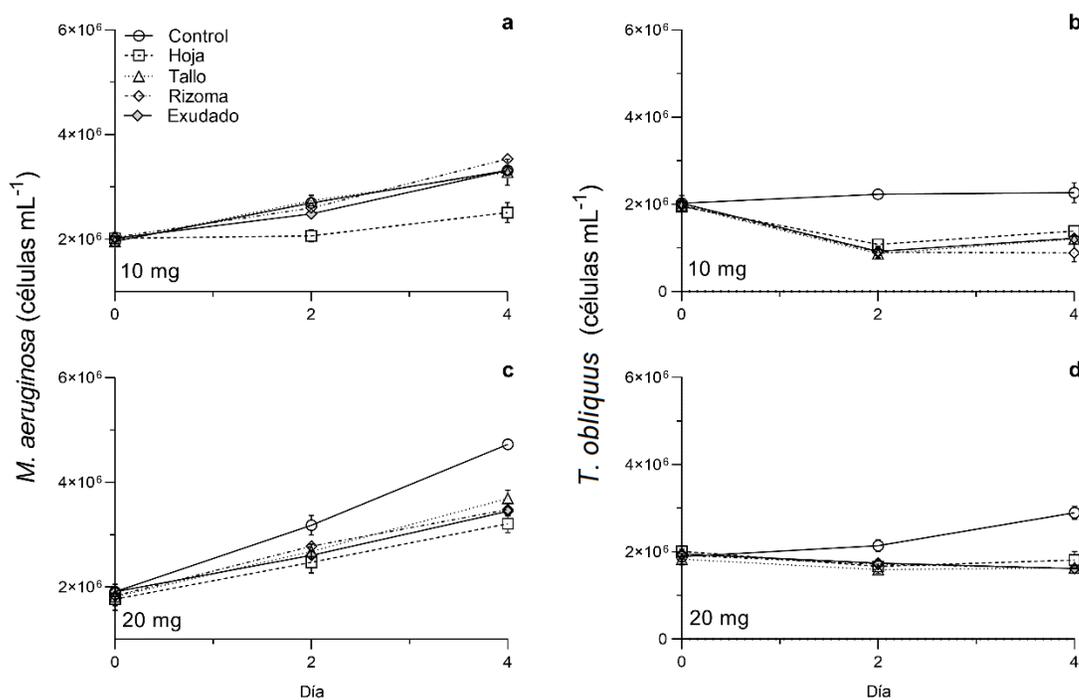


Figura 17. Efecto alelopático de *P. australis*. Macrofitas bajo crecimiento de laboratorio en condiciones óptimas de nutrientes y radiación luminosa como PhgL C. Se muestra el efecto de la concentración de 10 mg (a y b) y de 20 mg (c y d) en peso seco de los extractos acuosos de las partes estructurales de la macrofitas sobre *M. aeruginosa* y *T. obliquus*. Las barras de error se basan en tres réplicas.

6.5 Perfil químico de compuestos de naturaleza fenólica en los extractos de *Phragmites australis*

Dado que en el grupo de las macrofitas se han encontrado compuestos fenólicos con actividad alelopática sobre especies del fitoplancton, la realización de un perfil químico en *P. australis* develó si están presentes o no estos aleloquímicos.

El establecimiento del perfil químico de los extractos obtenidos y la identificación de los seis ácidos fenólicos identificados previamente como compuestos alelopáticos principalmente de *C. demersum*, *P. pectinatus*, *P. malaiianus*, *P. maackianus* y *M. spicatum* (ácido cumárico, ácido gálico, ácido catequínico, ácido benzoico, ácido ferúlico y ácido vanílico), empleando TLC, MS-DART y HPLC, permitió poner en evidencia que ninguno de los compuestos investigados están presentes en los extractos metanólicos de las estructuras vegetales de *P. australis*, ni en los exudados en las tres condiciones de crecimiento.

A través del perfil químico de *Phragmites*, utilizando SPME y análisis de la fase gas por GC-MS se identificaron 79 compuestos en las hoja (Cuadro 12) y 43 compuestos en el tallo (Cuadro 13). Los metabolitos secundarios se clasificaron de acuerdo con sus grupos funcionales y se encontraron en proporciones distintas entre ambas estructuras vegetales. En el tallo se encontró un 37% menos de compuestos con relación a los identificados en las hojas. Particularmente, en el tallo, la disminución de cada uno de los grupos fue: hidrocarburos 9%, cetonas 22%, aldehídos 47%, alcoholes 36%, ácidos carboxílicos 33%,

fenoles 67%, esterres 67% y ácidos grasos 50%. De acuerdo con los resultados obtenidos, la presencia de compuestos fenólicos correspondió a un 4% para la hoja y un 2% en el tallo. De los seis compuestos investigados en el presente trabajo, solo se encontró al ácido benzoico. No obstante, se identificó la presencia de otros dos compuestos fenólicos; el ácido benzoico, éster fenólico y el anhídrido cumarínico.

Cuadro 12. Perfil químico de *Phragmites*, muestras analizadas por SPME-GC-MS a partir de biomasa fresca de las estructuras vegetales de hoja. La estructura molecular de cada uno de los compuestos en anexo 2.

| No. | Grupo funcional Compuesto | Hoja | | | |
|----------------------|---|----------------|------------------------------|---|---------------------------|
| | | Área total (%) | Tiempo de retención (min) | Formula Molecular | Peso Molecular (g/mol) |
| Hidrocarburos | | | | | |
| 1 | (E)-2-butenilciclopropano | 0.08 | 5.33 | C ₇ H ₁₂ | 96.17 |
| 2 | 1,3-hexadieno, 3-etil-2-metil- | 0.16 | 6.38 | C ₉ H ₁₆ | 124.22 |
| 3 | 1-ciclohexeno-1-carboxaldehído, 2,6,6-trimetil- | 0.12 | 9.25 | C ₁₀ H ₁₆ O | 152.23 |
| 4 | 2-hexeno, 3,5,5-trimetil- | 0.17 | 5.47 | C ₉ H ₁₈ | 126.23 |
| 5 | 5,9-undecadien-2-ona, 6,10-dimetil-, (E)- | 0.26 | 12.32 | C ₁₃ H ₂₂ O | 194.31 |
| 6 | 5-hepten-2-ona, 6-metil- | 0.43 | 5.67 | C ₈ H ₁₄ O | 126.19 |
| 7 | 3-careno | 0.12 | 6.61 | C ₁₀ H ₁₆ | 136.23 |
| 8 | Etanona, 1-(3,4-dimetilfenil)- | 0.24 | 10.86 | C ₁₀ H ₁₂ O | 148.20 |
| 9 | Furano, 2-etil- | 0.21 | 2.16 | C ₆ H ₈ O | 96.12 |
| 10 | Furano, 2-pentil- | 0.13 | 5.74 | C ₉ H ₁₄ O | 138.20 |
| 11 | Furano, 2-propil- | 0.15 | 6.03 | C ₇ H ₁₀ O | 110.15 |
| Cetonas | | | | | |
| 12 | 2,3-Octanodiona | 0.09 | 5.60 | C ₈ H ₁₄ O ₂ | 142.19 |
| 13 | Ciclobutanona, 2,2,3-trimetil- | 0.43 | 2.72 | C ₇ H ₁₂ O | 112.16 |
| 14 | Ciclobutanona, 2,2-dimetil- | 0.07 | 5.39 | C ₆ H ₁₀ O | 98.14 |
| 15 | 1-penten-3-ona | 0.82 | 2.06 | C ₅ H ₈ O | 84.11 |
| 16 | 2-nonanona | 0.15 | 7.27 | C ₉ H ₁₈ O | 142.23 |
| 17 | 3-octanona | 0.66 | 5.66 | C ₈ H ₁₆ O | 128.21 |
| 18 | 3-pentanona | 0.65 | 2.13 | C ₅ H ₁₀ O | 86.13 |
| 19 | Benzofenona | 0.69 | 14.53 | C ₁₃ H ₁₀ O | 182.21 |
| 20 | Trans-beta-ionona | 0.07 | 12.80 | C ₁₃ H ₂₀ O | 192.29 |
| Aldehídos | | | | | |
| 21 | 2,4-heptadienal, (E, E)- | 0.25 | 5.81 | C ₇ H ₁₀ O | 110.15 |
| 22 | 2,4-hexadienal, (E,E)- | 1.20 | 4.51 | C ₆ H ₈ O | 96.12 |
| 23 | 2,6-nonadienal, (E,E)- | 0.27 | 8.20 | C ₉ H ₁₄ O | 138.20 |
| 24 | 2-butenal, 3-metil- | 0.16 | 2.60 | C ₅ H ₈ O | 84.11 |
| 25 | 2-heptenal, (E)- | 0.19 | 5.20 | C ₇ H ₁₂ O | 112.16 |
| 26 | 2-hexenal | 1.28 | 3.78 | C ₆ H ₁₀ O | 98.14 |
| 27 | 2-hexenal, (E)- | 1.28 | 3.63 | C ₆ H ₁₀ O | 98.14 |
| 28 | 2-nonenal, (E)- | 0.44 | 8.29 | C ₉ H ₁₆ O | 140.22 |
| 29 | Nonanal | 7.82 | 7.47 | C ₉ H ₁₈ O | 142.23 |
| 30 | 2-octenal, (E) - | 0.29 | 6.76 | C ₈ H ₁₄ O | 126.19 |
| 31 | Octanal | 0.98 | 5.90 | C ₈ H ₁₆ O | 128.21 |
| 32 | 2-pentenal, (E)- | 0.33 | 2.61 | C ₅ H ₈ O | 84.11 |
| 33 | 4-etil-2-hexinal | 0.14 | 6.14 | C ₈ H ₁₂ O | 124.18 |
| 34 | 4-heptenal, (E)- | 0.37 | 4.35 | C ₇ H ₁₂ O | 112.16 |
| 35 | 4-heptenal, (Z)- | 0.51 | 4.35 | C ₇ H ₁₂ O | 112.16 |
| 36 | Decanal | 1.15 | 8.96 | C ₁₀ H ₂₀ O | 156.26 |
| 37 | Dodecanal | 0.24 | 11.74 | C ₁₂ H ₂₄ O | 184.31 |
| 38 | Heptanal | 1.32 | 4.38 | C ₇ H ₁₄ O | 114.18 |
| 39 | Hexanal | 6.61 | 3.06 | C ₆ H ₁₂ O | 100.15 |
| Alcoholes | | | | | |
| 40 | 1-heptanol | 0.37 | 5.39 | C ₇ H ₁₆ O | 116.20 |

| Hoja | | | | | |
|----------------------------|---|-----------------------|--------------------------------------|--|-----------------------------------|
| No. | Grupo funcional Compuesto | Área total (%) | Tiempo de retención (min) | Formula Molecular | Peso Molecular (g/mol) |
| 41 | 1-hexanol | 7.25 | 3.99 | C ₆ H ₁₄ O | 102.17 |
| 42 | 1-nonanol | 0.93 | 8.44 | C ₉ H ₂₀ O | 144.25 |
| 43 | 1-octanol | 1.49 | 6.93 | C ₈ H ₁₈ O | 130.22 |
| 44 | 1-octen-3-ol | 0.22 | 5.54 | C ₈ H ₁₆ O | 128.21 |
| 45 | 1-pentanol | 0.28 | 2.42 | C ₅ H ₁₂ O | 88.14 |
| 46 | 1-penten-3-ol | 0.92 | 2.03 | C ₅ H ₁₀ O | 86.13 |
| 47 | 2-etil-1-hexanol | 0.20 | 6.30 | C ₈ H ₁₈ O | 130.22 |
| 48 | 2-hexen-1-ol, (Z)- | 4.64 | 3.93 | C ₆ H ₁₂ O | 100.15 |
| 49 | 2-penten-1-ol, (Z)- | 1.78 | 2.76 | C ₅ H ₁₀ O | 86.13 |
| 50 | 2-propil-1-pentanol | 0.28 | 6.29 | C ₈ H ₁₈ O | 130.22 |
| 51 | 3-hexen-1-ol, (Z)- | 11.35 | 3.82 | C ₆ H ₁₂ O | 100.15 |
| 52 | Ciclohexanol | 6.12 | 3.96 | C ₆ H ₁₂ O | 100.15 |
| 53 | Glicidol | 0.74 | 1.30 | C ₃ H ₆ O ₂ | 74.07 |
| Ácidos carboxílicos | | | | | |
| 54 | Ácido acético | 0.34 | 2.47 | C ₂ H ₄ O ₂ | 60.05 |
| 55 | Butirolactona | 0.16 | 5.43 | C ₄ H ₆ O ₂ | 86.08 |
| 56 | Ácido oxálico | 1.31 | 3.04 | C ₂ H ₂ O ₄ | 90.03 |
| Fenoles | | | | | |
| 57 | Ácido benzoico | 0.72 | 8.52 | C ₇ H ₆ O ₂ | 122.12 |
| 58 | Ácido benzoico, éster fenílico | 0.11 | 14.83 | C ₁₃ H ₁₀ O ₂ | 198.21 |
| 59 | Anhídrido cumarínico | 0.03 | 12.21 | C ₉ H ₆ O ₂ | 146.14 |
| Fenil | | | | | |
| 60 | Oxima-, metoxi-fenil- | 6.66 | 4.71 | C ₈ H ₉ NO ₂ | 151.16 |
| Esteres | | | | | |
| 61 | Ácido hexanoico, éster 3-hexenílico, (Z)- | 0.23 | 11.38 | C ₁₂ H ₂₂ O ₂ | 198.30 |
| 62 | Ácido hexanoico, éster etílico | 0.09 | 5.84 | C ₈ H ₁₆ O ₂ | 144.21 |
| 63 | Éster vinílico del ácido n-caproico | 0.20 | 5.60 | C ₈ H ₁₄ O ₂ | 142.19 |
| Eteres | | | | | |
| 64 | Dietil carbitol | 0.07 | 6.40 | C ₈ H ₁₈ O ₃ | 162.22 |
| 65 | Dimetil éter | 0.67 | 1.35 | C ₂ H ₆ O | 46.06 |
| Ácidos grasos | | | | | |
| 66 | Ácido n-decanoico | 0.10 | 11.14 | C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | 172.26 |
| 67 | Ácido n-hexadecanoico | 0.30 | 17.90 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 256.42 |

Cuadro 13. Perfil químico de *Phragmites*, muestras analizadas por SPME-GC-MS a partir de biomasa fresca de las estructuras vegetales de tallo. La estructura molecular de cada uno de los compuestos en anexo 2.

| No. | Grupo funcional Compuesto | Área Total (%) | Tiempo de retención (min) | Formula Molecular | Peso Molecular (g/mol) |
|----------------------------|---|-------------------|---------------------------------|--|---------------------------|
| Hidrocarburos | | | | | |
| 1 | 1,3-hexadieno, 3-etil-2-metil- | 0.73 | 6.38 | C ₉ H ₁₆ | 124.22 |
| 2 | 5,9-undecadien-2-ona, 6,10-dimetil-, (E)- | 0.38 | 12.32 | C ₁₃ H ₂₂ O | 194.31 |
| 3 | 5,9-undecadien-2-ona, 6,10-dimetil-, (Z)- | 0.43 | 12.32 | C ₁₃ H ₂₂ O | 194.31 |
| 4 | 5-hepten-2-ona, 6-metil- | 0.37 | 5.66 | C ₈ H ₁₄ O | 126.19 |
| 5 | Ciclobutano, butil- | 0.57 | 6.93 | C ₈ H ₁₆ | 112.21 |
| 6 | Ciclopropano, propil- | 0.98 | 3.93 | C ₆ H ₁₂ | 84.15 |
| 7 | Eteno, fluoro- | 0.73 | 2.94 | C ₂ H ₃ F | 46.04 |
| 8 | Furano, 2-pentil- | 0.40 | 5.74 | C ₉ H ₁₄ O | 138.20 |
| 9 | Pentano, 1-cloro- | 0.26 | 2.41 | C ₅ H ₁₁ Cl | 106.59 |
| 10 | trans-beta-ocimeno | 0.28 | 6.61 | C ₁₀ H ₁₆ | 136.23 |
| Cetonas | | | | | |
| 11 | 1-penten-3-ona | 0.90 | 2.06 | C ₅ H ₈ O | 84.11 |
| 12 | 3-butilisobenzofurano-1(3H)-ona | 0.43 | 10.88 | C ₁₂ H ₁₄ O ₂ | 190.23 |
| 13 | 3-pentanona | 0.90 | 2.13 | C ₅ H ₁₀ O | 86.13 |
| 14 | Ciclopentanona | 0.82 | 2.07 | C ₅ H ₈ O | 84.11 |
| 15 | Etanona, 1-(2,4-dimetilfenil)- | 2.28 | 10.83 | C ₁₀ H ₁₂ O | 148.20 |
| 16 | Etanona, 1-(2,5-dimetilfenil)- | 0.87 | 10.83 | C ₁₀ H ₁₂ O | 148.20 |
| 17 | Etanona, 1,1'-(1,4-fenileno)bis- | 0.40 | 12.12 | C ₁₀ H ₁₀ O ₂ | 162.18 |
| Aldehídos | | | | | |
| 18 | 2-hexenal | 3.56 | 3.73 | C ₆ H ₁₀ O | 98.14 |
| 19 | 2-hexenal, (E)- | 1.98 | 3.71 | C ₆ H ₁₀ O | 98.14 |
| 20 | 2-octenal, (E) - | 0.95 | 6.75 | C ₈ H ₁₄ O | 126.19 |
| 21 | 3-hexenal | 4.30 | 3.03 | C ₆ H ₁₀ O | 98.14 |
| 22 | Nonanal | 2.44 | 7.46 | C ₉ H ₁₈ O | 142.23 |
| 23 | Octanal | 0.34 | 5.91 | C ₈ H ₁₆ O | 128.21 |
| 24 | Decanal | 0.48 | 8.96 | C ₁₀ H ₂₀ O | 156.26 |
| 25 | Heptanal | 1.00 | 4.38 | C ₇ H ₁₄ O | 114.18 |
| 26 | Hexanal | 0.94 | 3.06 | C ₆ H ₁₂ O | 100.15 |
| 27 | Hexanal, 3-metil- | 0.40 | 4.38 | C ₇ H ₁₄ O | 114.18 |
| Alcoholes | | | | | |
| 28 | 1-heptanol | 0.17 | 5.39 | C ₇ H ₁₆ O | 116.20 |
| 29 | 1-hexanol | 1.02 | 3.92 | C ₆ H ₁₄ O | 102.17 |
| 30 | 1-nonanol | 0.41 | 8.44 | C ₉ H ₂₀ O | 144.25 |
| 31 | 1-pentanol | 0.42 | 2.71 | C ₅ H ₁₂ O | 88.14 |
| 32 | 2-penten-1-ol, (Z) - | 0.44 | 2.75 | C ₅ H ₁₀ O | 86.13 |
| 33 | 2-propil-1-pentanol | 0.19 | 6.30 | C ₈ H ₁₈ O | 130.22 |
| 34 | 3-hexen-1-ol, (Z)- | 1.69 | 3.76 | C ₆ H ₁₂ O | 100.15 |
| 35 | 3-metil-3-oxetanometanol | 0.19 | 5.54 | C ₅ H ₁₀ O ₂ | 102.13 |
| 36 | Ciclobutanol | 1.48 | 1.29 | C ₄ H ₈ O | 72.10 |
| Ácidos carboxílicos | | | | | |
| 37 | Ácido acético | 0.73 | 2.79 | C ₂ H ₄ O ₂ | 60.05 |
| 38 | Ácido fórmico | 0.35 | 2.69 | CH ₂ O ₂ | 46.02 |
| Fenoles | | | | | |
| 39 | Ácido benzoico | 0.57 | 8.50 | C ₇ H ₆ O ₂ | 122.12 |
| Fenil | | | | | |
| 40 | Oxima-, metoxi-fenil_ | 56.84 | 5.19 | C ₈ H ₉ NO ₂ | 151.16 |
| Eteres | | | | | |
| 41 | Difenil éter | 0.97 | 11.73 | C ₁₂ H ₁₀ O | 170.20 |
| Ácidos grasos | | | | | |
| 42 | Ácido n-hexadecanoico | 0.35 | 17.89 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 256.42 |

6.6 Evaluación del efecto alelopático de *Phragmites* en un sistema de isla flotante con macrofita (IFM) en el embalse de Valle de Bravo sobre especies del fitoplancton

La evaluación del efecto de PhgA sobre las especies del fitoplancton, fue constituida en parte por la influencia del ambiente y sus componentes relacionados al crecimiento estacional de las especies algales (análisis de variables fisicoquímicas del agua y variables biológicas) y por otra, la adición de la presencia de *Phragmites* como factor biológico de variación ambiental e/o inhibición.

El comportamiento de los nitratos (NO_3^-) en el sitio control registró una tendencia estacional, en la cual la temporada de secas (Dry Season, DS) presentó valores superiores en el ciclo anual I (C-I) de $0.79 \pm 0.11 \text{ mg L}^{-1}$ y de $0.49 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$ en el ciclo anual II (C-II), en comparación con la temporada de lluvias (Rainy Season, RS), que registró $0.33 \pm < 0.01 \text{ mg L}^{-1}$ y $0.41 \pm < 0.01 \text{ mg L}^{-1}$ en C-II. En cuanto a la presencia de la IFM, esta tuvo un efecto de incremento significativo ($p < 0.05$) de los NO_3^- durante la temporada de RS en C-I, mientras que durante C-II, lo fue en la temporada de DS, con respecto al control (Figura 18a).

Los fosfatos (PO_4^{3-}) mostraron un comportamiento de tendencia anual que estacional, en la cual durante DS ($0.03 \pm < 0.01 \text{ mg L}^{-1}$) y RS ($0.06 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$) de C-I los valores fueron inferiores que los registrados para las temporadas en C-II (DS: $0.09 \pm < 0.01 \text{ mg L}^{-1}$, RS: $0.09 \pm < 0.01 \text{ mg L}^{-1}$). La presencia de la IFM tuvo un efecto alternado sobre este

nutriente, incremento durante DS en C-I y de disminución en RS en C-II, ambos ($p < 0.05$) en comparación al control (Figura 18b).

En cuanto al pH, en el sitio control se presentaron valores menores en DS (C-I: 7.3 ± 0.3 , C-II: 6.8 ± 0.3) que en RS (C-I: 7.8 ± 0.2 , C-II: 7.4 ± 0.1) donde se observó una tendencia al incremento, comportamiento que fue acentuado en el sitio de IFM, siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) que el control (Figura 18c). La temperatura en el control fue que durante DS (C-I: 20.1 ± 0.3 °C, C-II: 21.2 ± 0.8 °C) se presentó menor que durante RS (C-I: 23.3 ± 0.3 °C, C-II: 23.3 ± 0.2 °C), en ambos ciclos. En este caso, la IFM no mostró efecto sobre la variación de la temperatura con respecto al sitio control (Figura 18d). Semejante a la tendencia de temperatura, la turbiedad durante DS (C-I: 6.1 ± 0.5 NTU, C-II: 9.8 ± 0.8 NTU) fue inferior a RS (C-I: 19.3 ± 0.2 NTU, C-II: 24.2 ± 4.2 NTU) en el periodo de estudio. Asimismo, en el sitio de la IFM no se registró efecto distinto al observado en el control (Figura 18e).

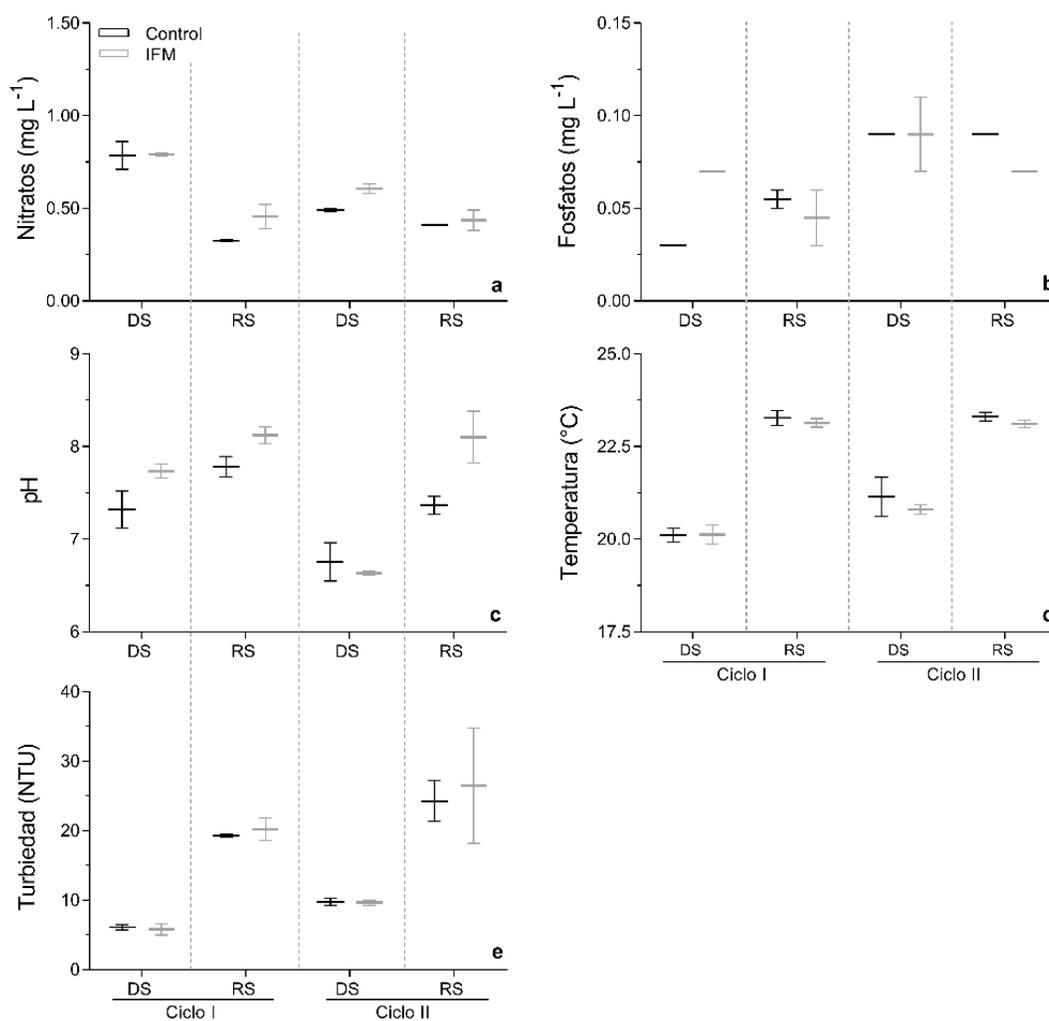


Figura 18. Cuadro de bigotes de descriptores hidrológicos de la calidad del agua relacionados con el estado trófico del embalse. El eje X representa el período de estudio, de octubre de 2016 a marzo de 2017 temporada de secas (DS), de abril a septiembre de 2017 la temporada de lluvias (RS), que corresponde al primer ciclo anual (C-I) y de octubre de 2017 a marzo de 2018 la temporada de secas temporada y de abril a septiembre de 2018 la temporada de lluvias, que corresponde al segundo ciclo anual (C-II). Los valores de desviación estándar y promedio se encuentran a 1 y 2 m de profundidad. Isla flotante con macrofitas plantadas con *Phragmites australis* como IFM.

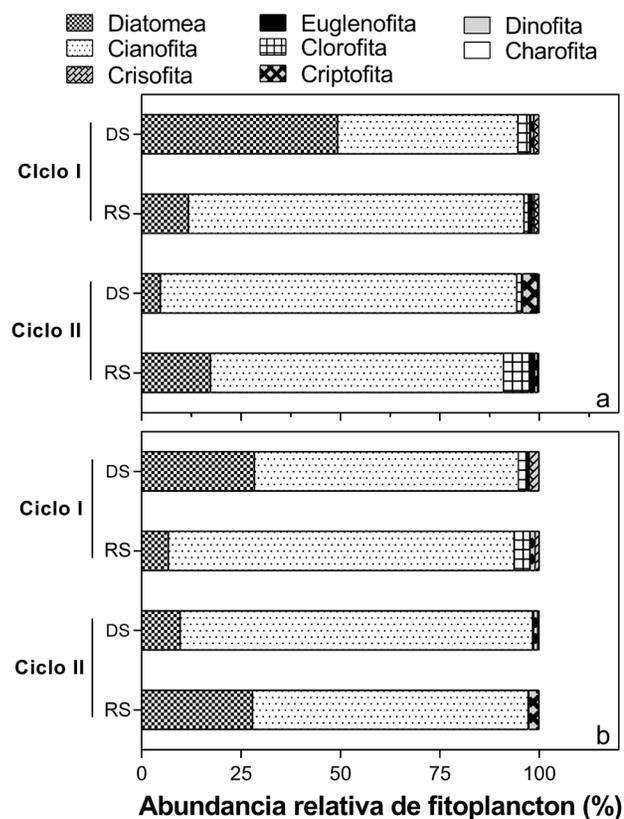


Figura 19. Abundancia relativa de fitoplancton. Las especies fueron categorizadas en Phylum taxonómico para el sitio control y la IFM. Se consideró la densidad celular de las especies registradas a 1 y 2 m de profundidad.

En el sitio de estudio (Obra de toma) del embalse Valle de Bravo se identificaron 36 especies del fitoplancton, de estas las cianobacterias estuvieron agrupadas en cuatro ordenes (Oscillatoriales, Chroococcales, Synechococcales and Nostocales) representadas por 15 especies (Cuadro 14).

Cuadro 14. Especies del fitoplancton encontradas en el embalse Valle de Bravo durante el período de octubre de 2016 a septiembre de 2018.

| | | |
|--|---|--|
| Phylum Bacillariophyta Order Melosirales 1. <i>Melosira varians</i> C. Agardh 1827 Order Fragilariiales 2. <i>Fragilaria crotonensis</i> Kitton 1869 Order Chaetocerotales 3. <i>Acanthoceras zachariasii</i> (Brun) Simonsen 1979 Order Aulacoseirales 4. <i>Aulacoseira granulata</i> (Ehrenberg) Simonsen 1979 Phylum Chlorophyta Order Chlorellales 5. <i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck [Beijerinck] 1890 6. <i>Oocystis marssonii</i> Lemmermann 1898 7. <i>Oocystis pusilla</i> Hansgirg 1890 Order Chlamydomonadales 8. <i>Chlamydomonas globosa</i> J.W. Snow 1903 9. <i>Pteromonas angulosa</i> (H.J. Carter) Lemmermann 1900 10. <i>Chlorogonium minimum</i> Playfair 1918 Order Sphaeropleales 11. <i>Monoraphidium nanum</i> (Ettl) Hindák 1980 12. <i>Monoraphidium arcuatum</i> (Korshikov) Hindák 1970 13. <i>Monactinus simplex</i> (Meyen) Corda 1839 14. <i>Monoraphidium irregulare</i> (G.M. Smith) Komárková-Legnerová 1969 | Phylum Euglenozoa Order Euglenida 15. <i>Euglena viridis</i> (O.F. Müller) Ehrenberg 1830 16. <i>Trachelomonas irregularis</i> Svireenko 1914 17. <i>Trachelomonas ovata</i> Y. V. Roll 1925 Phylum Charophyta Order Desmidiiales 18. <i>Staurastrum longiradiatum</i> West and G. S. West 1896 Phylum Cryptophyta Order Cryptomonadales 19. <i>Cryptomonas ovata</i> Ehrenberg 1832 Phylum Miozoa Order Gonyaulacales 20. <i>Ceratium hirundinella</i> (O.F. Müller) Dujardin 1841 Phylum Ochrophyta Order Chromulinales 21. <i>Ochromonas</i> sp. Phylum Cyanobacteria Order Oscillatoriales 22. <i>Planktothrix agardhii</i> (Gomont) Anagnostidis and Komárek 1988 23. <i>Limnospira birgei</i> (G.M. Smith) J. Komárek, E. Zapomelová, J. Smarda, J. Kopecký, E. Rejmánková, J. Woodhouse, B.A. Neilan & J. Komárek 2013 24. <i>Arthrospira</i> sp. 25. <i>Arthrospira jenneri</i> Stizenberger ex Gomont 1892 Order Chroococcales 26. <i>Microcystis wesenbergii</i> (Komárek) Komárek ex Komárek in Joosen 2006 | 27. <i>Limnococcus limneticus</i> (Lemmermann) Komárková, Jezberová, O. Komárek & Zapomelová 2010 28. <i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing 1846 29. <i>Microcystis flos-aquae</i> (Wittrock) Kirchner 1898 30. <i>Chroococcus dispersus</i> (Keissler) Lemmermann 1904 Order Synechococcales 31. <i>Pseudanabaena mucicola</i> (Naumann and Huber-Pestalozzi) Schwabe 1964 32. <i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Kützing 1845 33. <i>Cyanodictyon</i> sp. 34. <i>Synechococcus subsalsus</i> Skuja 1939 Order Nostocales 35. <i>Dolichospermum planctonicum</i> (Brunnthal) Wacklin, L. Hoffmann & Komárek 2009 36. <i>Aphanizomenon yezeense</i> M. Watanabe 1991 |
|--|---|--|

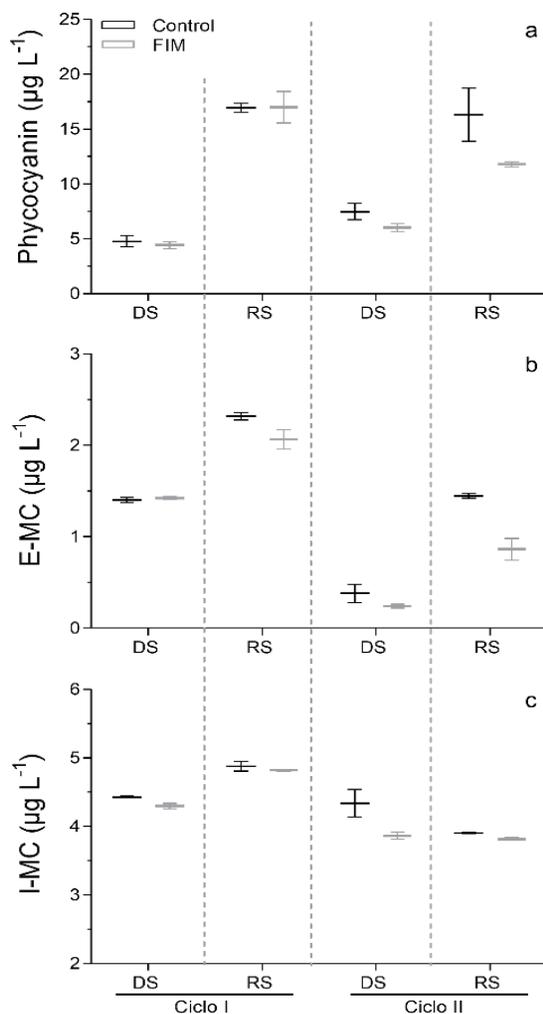


Figura 20. Variables biológicas asociadas a la presencia de cianobacterias. En el eje X, la temporada de secas como DS y la temporada de lluviosas como RS. Ambas temporadas representadas durante el período de estudio en dos ciclos anuales como C-I y C-II. Los valores de desviación estándar y promedio se encuentran a 1 y 2 m de profundidad.

La distribución de la biomasa del fitoplancton tanto en el sitio control como en la IFM encontró dominancia por dos grupos taxonómicos, diatomeas y cianobacterias. En control en la temporada de secas (DS) durante el ciclo anual I (C-I), la proporción entre estos dos grupos fue de $49 \pm 2\%$ para diatomeas y $45 \pm 3\%$ para cianobacterias, mientras que en menor proporción los grupos correspondientes a Clorofita $3 \pm 1\%$, Crisofita $1 \pm 1\%$ y $< 1\%$ Euglenofita, Dinofita, Criptofita y Carofita. Durante las siguientes tres temporadas, las

cianobacterias incrementaron su biovolumen, en temporada de lluvias (RS) $85 \pm 6\%$ en C-I, y durante el ciclo anual II (C-II) DS: $90 \pm 10\%$ y RS: $74 \pm 21\%$, por lo que las diatomeas decrecieron (Figura 19a). En el sitio IFM la biomasa de cianobacterias mostro una mayor tendencia a la dominancia sobre las diatomeas, que la observada en el sitio control, pero esto fue únicamente en DS de C-I ($65 \pm 32\%$). Después el biovolumen de las cianobacterias fue similar en ambos sitios durante el resto del estudio (Figura 19b).

A partir de estos resultados sobre la dinámica del fitoplancton en el embalse, el enfoque sobre el efecto de *Phragmites* fue dirigido hacia el grupo de las cianobacterias. Por tanto, se analizaron las variables biológicas asociadas su presencia como la ficocianina (phycocyanin PC, por sus siglas en inglés) como un indicador indirecto de la biomasa. En el control, el registro de este pigmento fue con tendencia a valores bajos durante DS (C-I: $4.8 \pm 0.7 \mu\text{g L}^{-1}$, C-II: $7.5 \pm 1.1 \mu\text{g L}^{-1}$) con incremento en RS (C-I: $17 \pm 0.6 \mu\text{g L}^{-1}$, C-II: $16.3 \pm 3.4 \mu\text{g L}^{-1}$). En el sitio de la IFM se observó la misma tendencia estacional que en el control, sin embargo, las concentraciones de PC fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que el control (Figura 20a).

La presencia de microcistina-LR extracelular e intracelular (E-MC y I-MC, respectivamente) como indicador de la actividad metabólica de aquellas cianobacterias capaces de producir toxinas. En el sitio control la concentración de E-MC mostro una tendencia de comportamiento estacional semejante que PC, de manera que la toxina registró valores inferiores durante DS (C-I: $1.4 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, C-II: $0.4 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$) en comparación con RS (C-I: $2.3 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, C-II: $1.5 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$). El sitio IFM registró una

concentración significativamente menor ($p < 0.05$) únicamente durante RS en ambos ciclos anuales, con respecto al sitio control (Figura 20b). En cuanto a I-MC, esta registró un comportamiento estacional semejante durante secas y lluvias que los variables biológicos anteriores (DS en C-I: $4.4 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, C-II: $4.3 \pm 0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ y en RS de C-I: $4.9 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$, C-II: $3.9 \pm 0.1 \mu\text{g L}^{-1}$). En este caso IFM mostró un decremento significativo ($p < 0.05$) en ambas temporadas de C-II, respecto a lo registrado en el control (Figura 20c).

Con relación a las especies que conformaron el grupo de cianobacterias, de las quince identificadas en el embalse, nueve fueron potencialmente tóxicas: *M. flos-aquae*, *M. botrys*, *Oscillatoria* sp., *P. planctonica*, *M. aeruginosa*, *A. yezoense*, *P. mucicola*, *D. planctonicum* y *P. agardhii*. Las primeras cuatro especies, debido a su bajo biovolumen registrado ($1 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$) durante el estudio, no se consideraron para su evaluación relacionada con la presencia de la IFM. En cambio, las otras cinco especies al encontrarse con mayor biovolumen y mostrar un comportamiento estacional se sometieron a los análisis de comparación entre el sitio control y la IFM.

P. agardhii. Su presencia fue intermitente y presentó un biovolumen máximo en RS de C-I de $27 \pm 1 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ en el control y de $29 \pm 3 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ en la IFM, sin embargo, ambos sitios no fueron significativamente diferentes (Figura 21a).

P. mucicola: se observó también que durante RS de C-I se registró su biovolumen más alto, en el control fue de $13 \pm 5 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ y en la IFM, su presencia fue significativamente mayor con $59 \pm 5 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ (Figura 21b).

D. planctonicum. En el sitio control durante C-I en DS su biovolumen fue escaso con $21 \pm 14 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$, pero su biovolumen incrementó drásticamente en la siguiente RS con $609 \pm 401 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$. En C-II su comportamiento mostró un descenso sostenido durante las dos temporadas con $235 \pm 217 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ en DS y de $217 \pm 42 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ en RS. La presencia de la IFM no mostro efecto sobre su crecimiento o dinámica estacional (Figura 21c).

A. yezoense: presentó su mayor biovolumen en DS en C-I con $683 \pm 75 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$, mientras que en las siguientes temporadas registró un decremento sostenido en un intervalo entre 218 y $326 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$. En presencia de la IFM, esta cianobacteria mostró un comportamiento estacional significativamente opuesto, en DS en C-I con $368 \pm 162 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ y en las tres temporadas siguientes en un intervalo entre 815 y $422 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ (Figura 21d).

M. aeruginosa. En el control, esta cianobacteria registró su mayor biovolumen en RS de C-II con $3265 \pm 640 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ y mostró un decremento significativo en presencia de la IFM con un biovolumen de $647 \pm 103 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$. En las otras tres temporadas anteriores no hubo diferencias entre control y IFM (Figura 21e).

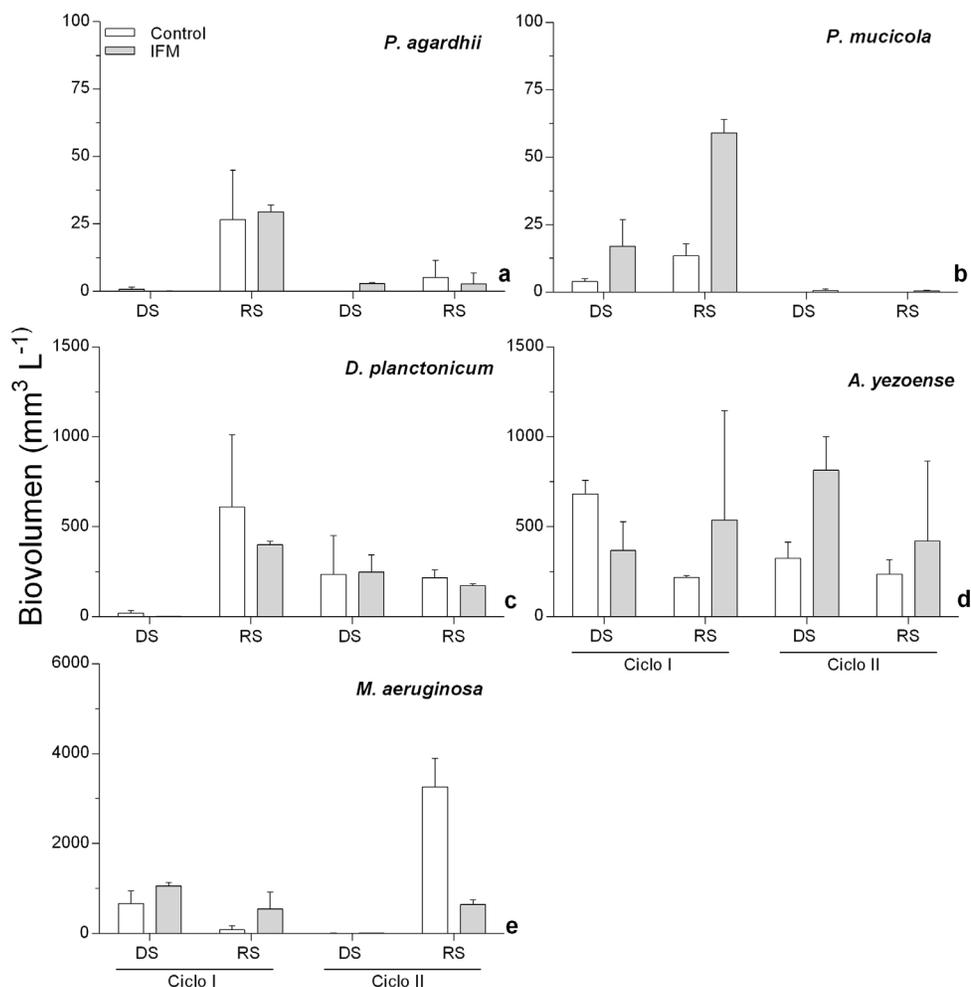


Figura 21. Densidad celular estacional de las cinco especies de cianobacterias potencialmente tóxicas con mayor recurrencia encontrada en los sitios control y IFM. Los valores de desviación estándar y promedio se encuentran a 1 y 2 m de profundidad durante los ciclos anuales C-I y C-II.

Por otra parte, los resultados de las interacciones entre los factores ambientales y la presencia de las cianobacterias, a través de los análisis de correspondencia canónica (CCA, Canonical Correlation Analysis), fueron: en el sitio control durante DS, los indicadores biológicos de la presencia de las cianobacterias como ficocianina (PC), microcistina extracelular (E-MC) y microcistina intracelular (I-MC) estuvieron asociados principalmente con los nitratos (NO_3^-). Este nutriente registró una mayor correlación en particular con la cianobacteria *A.*

yezoense (A.y) (Figura 22 a). El efecto de la IFM mostró un cambio en la composición biológica de las cianobacterias, en donde PC, E-MC, I-MC se asociaron ahora con los fosfatos (PO_4^{3-}) y la temperatura (TEMP), principalmente. Además, se observó que la especie con mayor correlación a los NO_3^- fue en este caso *M. aeruginosa* (M.a) (Figura 22b).

En RS en el sitio control, los indicadores de cianobacterias (PC, E-MC, I-MC) se relacionaron con TEMP y PO_4^{3-} principalmente y en menor medida con la transparencia (TRANS) y pH. De las cinco cianobacterias, *D. planctonicum* (D.p) fue quien mostró mayor asociación con estas variables, mientras que M.a se relacionó principalmente con TEMP y la turbiedad (NTU) y *P. agardhii* (P.a) fue cercana a los nitratos (Figura 22c). Para este periodo la presencia de la IFM también modificó la composición biológica del sitio, de manera que el grupo de cianobacterias a través de las variables PC, E-MC e I-MC se asociaron a TEMP, PO_4^{3-} y NO_3^- y las especies relacionadas a estos factores fueron M.a y D.p (Figura 22d. Publicación de resultados en revista indexada como ANEXO 1).

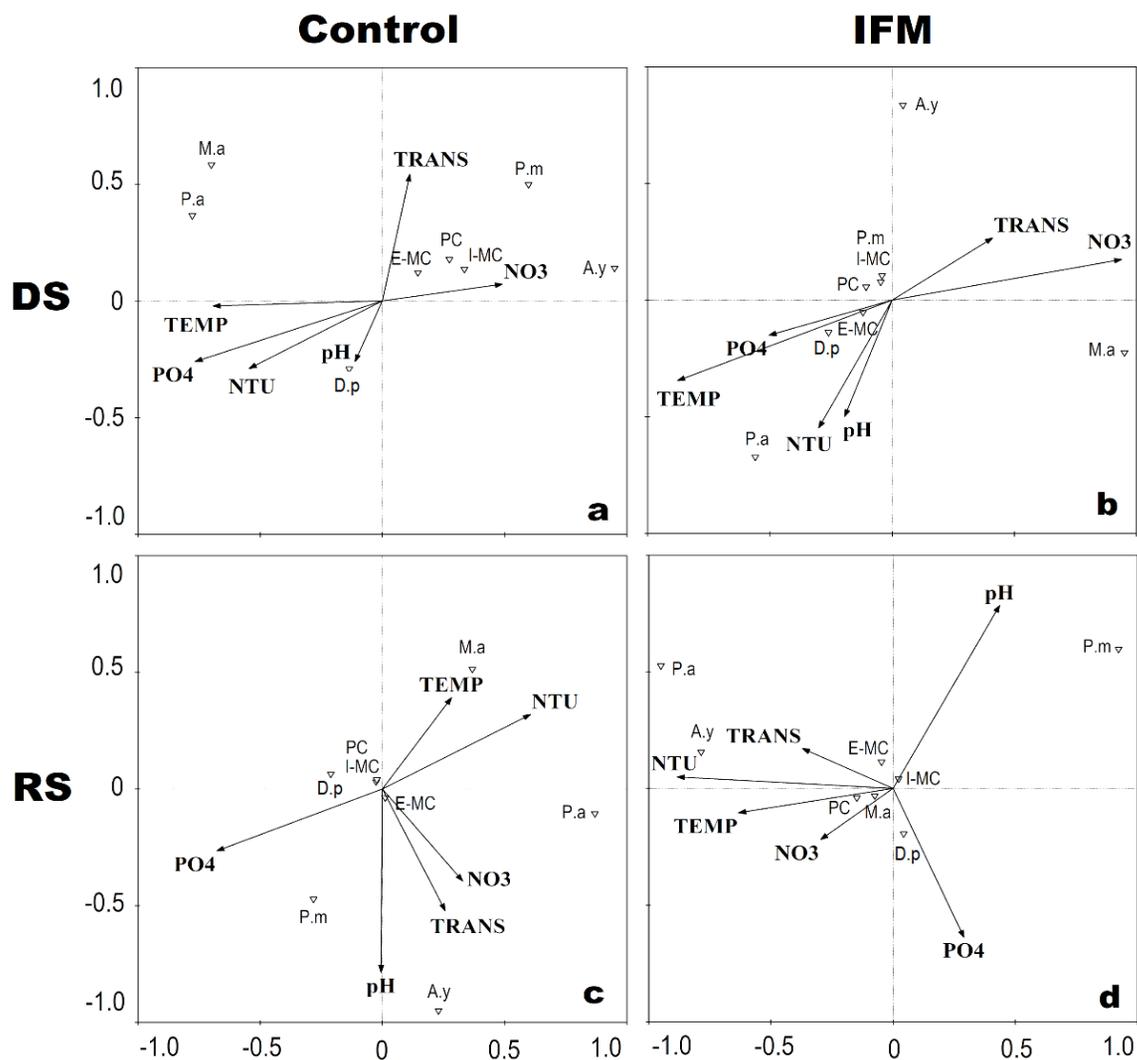


Figura 22. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) en el sitio control e IFM. Valores estacionales de biovolumen de las cinco especies de cianobacterias con mayor recurrencia, los datos usados de los descriptores hidrológicos y las variables fisicoquímicas asociadas con las cianobacterias para el análisis fueron: TEMP (temperatura), TRANS (transparencia), pH, NTU (turbidez), NO_3^- (nitratos), PO_4^{3-} (fosfatos). P.a (*P. agardhii*) P.m (*P. mucicola*), D.p (*D. planctonicum*), A.y (*A. yezoense*), M.a (*M. aeruginosa*), I-MC (microcistina intracelular) E-MC (microcistina extracelular) y PC (ficocianina). Biplot basado en CCA. Control: DS eje X 59.2, eje Y 29.6; RS eje X 56.0, eje Y 26.6. IFM: DS eje X 52.2, eje Y 34.9; RS eje X 58.5, eje Y 26.3.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio abordó el potencial alelopático de *Phragmites* bajo condiciones de crecimiento en laboratorio y ambiental como PhgL y PhgA, respectivamente. Bajo ambas condiciones de crecimiento se cuantificó el contenido de FT en hoja, tallo y rizoma. Los FT fueron obtenidos partir de extracciones acuosas y con diferentes disolventes orgánicos, de los cuales el MeOH mostró mayor eficiencia de extracción y fue utilizado en los análisis cromatográficos para la detección particular de seis fenoles propuestos con actividad alelopática presentes en la macrofita. *In vitro*, se evaluó en *Phragmites* tanto el efecto de la disminución de la radiación luminosa como de nitrógeno y fósforo, ambos factores como elementos de estrés asociados al incremento de la producción de FT. Asimismo, se determinó la actividad de inhibición de los extractos acuosos de hoja, tallo y rizoma de la macrofita sobre el crecimiento de *M. aeruginosa* y *T. obliquus*. Bajo condiciones ambientales en el embalse de Valle de Bravo, se evaluó un modelo piloto de IFM con *Phragmites*, el cual durante dos años se monitoreo mensualmente su capacidad de rehabilitación en la calidad del agua y su efecto sobre la densidad de cianobacterias.

7.1 Contenido de FT en *Phragmites australis*

En los resultados se observó que la hoja fue la estructura con el mayor contenido de FT tanto en los extractos acuosos como en los metanólicos, tal distribución resulto coincidente con lo que se presenta en la literatura para otras poblaciones de *Phragmites* (Uddin et al., 2012, 2017). Sin embargo, se encontró variación en lo que se refiere a las condiciones de

crecimiento, donde PhgA mostró un mayor contenido de FT en comparación con PhgL, así también de manera individual en cada macrofita. Esto se explica debido a la influencia específica de los factores ambientales que intervienen en su desarrollo, que pueden ser desde microcambios en el hábitat, capaces de establecer nuevas características en el organismo (Kala et al., 2016; Lavola et al., 2017). De esta forma, la concentración de fenoles está influenciada en parte por antecedentes genéticos de la planta y en parte por los factores ambientales, en los cuales se encuentra la disponibilidad de nutrientes y luz (Connor et al., 2002; Colin y Eguiarte, 2020; Milke et al., 2020).

Con base en lo anterior, la variabilidad observada en este estudio sugiere una influencia de la condición ambiental del embalse de Valle de Bravo, que activa la plasticidad fenotípica de la planta a nuevos ambientes y prosperar en ellos, tal y como se propone para el género *Phragmites* como especie invasora exitosa (Harrison et al., 2017; Zimmerman et al., 2018; Ren et al., 2020). Por lo que la exposición ambiental de *Phragmites* se tradujo posiblemente en la síntesis de más cantidad de fenoles a diferencia de PhgL E, que a pesar de registrar un valor promedio ligeramente superior que el control no significó una condición que promoviera la producción de FT.

7.2 Efecto de la disminución de irradiancia luminosa y nutrientes en *Phragmites*

El estrés evaluado como disminución de la irradiancia luminosa, nitrógeno y fósforo en PhgL E no afectó la tasa de consumo de estos nutrientes, con un registro semejante al de PhgL C. Estos resultados son consistentes con la capacidad de absorción en *Phragmites*, la

cual cumple una función amortiguadora de almacenar N y P aún en medios con baja disponibilidad de nutrientes (Meuleman et al. 2002). Por tanto, estas características fisiológicas le confieren a *Phragmites* una ventaja adaptativa para su amplia distribución en diversos ambientes (Li et al., 2014; Srivastava et al., 2014). Con base en estos criterios, se sugiere que, para la realización de este tipo de estudios, un acondicionamiento previo de inanición hubiera permitido observar una diferencia entre las condiciones de crecimiento óptimas y deficientes.

Por otra parte, cuando se trata del crecimiento de la macrofitas en ambientes con enriquecimiento de nutrientes, la planta responde aumentando su propagación sobre otras especies (Leishman y Thomson, 2005; McCormick et al., 2010), lo que sugiere activa su metabolismo de síntesis de compuestos alelopáticos involucrados en la competencia con otros organismos (Xiao et al., 2019). Este comportamiento, pudiera estar relacionado, no directamente con la tasa de consumo de nitrógeno y fósforo para PhgA en este estudio (ya que no se evaluó en esta condición de crecimiento), sino con la producción de FT, la cual fue mayor en PhgA en comparación con PhgL. Estudios en invernadero bajo ambientes de humedales con altos contenidos de NO_3^- y PO_4^{3-} , han demostrado que los sitios de colonización por *Phragmites* contienen un alto contenido de compuestos fenólicos, que provienen de la macrofitas y son liberados al medio, lo que indica una correlación entre la concentración de nutrientes, la presencia de fenoles y la ventaja competitiva inherente de esta macrofitas sobre otras plantas cuando crecen en sistemas biológicos de tratamiento de aguas (Ge et al., 2017; Uddin et al., 2018; Rooney y Yuckin, 2019).

7.3 Efecto alelopático de *Phragmites australis* sobre *Microcystis aeruginosa* y *Tetrademus obliquus*

Al evaluar el potencial alelopático de los extractos acuosos de las estructuras vegetales de *Phragmites*, se encontró una diferencia de mayor efecto sobre *M. aeruginosa*, con 10 mg del extracto de hoja en comparación con el obtenido de tallo, rizoma y exudado. Esto pudo deberse a que la distribución de FT, como se ha evaluado en *Phragmites* en otros trabajos han registrado a la hoja como el órgano vegetal con mayor contenido de FT en comparación con las otras estructuras de la planta (Uddin et al., 2012, 2017).

En cuanto a *T. obliquus*, los cuatro extractos mostraron inhibición. Esto pudo deberse por la variación en la sensibilidad para cada especie del fitoplancton a las sustancias bioactivas producidas por las macrofitas (Mohamed 2017). Por ejemplo, Li y Hu (2005) reportaron que el extracto crudo de *E. crassipes* mostró efecto alelopático para el alga *Chlorella vulgaris*, pero no para las cianobacterias *S. platensis* y *N. piscinale*. Por lo que, el grado de inhibición que tiene una sustancia bioactiva está relacionado con las características particulares de la especie receptora (Nakai et al., 2008; Gao et al., 2011). Además, algunas especies pueden ser resistentes a concentraciones determinadas, mientras que otras no (Švanys et al., 2014).

En la concentración de 20 mg para los extractos de hoja, tallo, rizoma, estos mostraron un efecto de inhibición semejante entre ellos y en ambas especies, por lo que no se presentó una relación entre distribución del contenido de FT y el efecto alelopático. Esto sugiere que

probablemente el mismo tipo de compuestos alelopáticos está presente en todos los extractos y son los causantes del efecto de inhibición observado en los bioensayos, y que al parecer no corresponde a los compuestos de naturaleza fenólica. Esto debido a que con excepción del ácido benzoico identificado por SPME-GC-MS como parte de la mezcla de compuestos orgánicos volátiles presentes en *Phragmites* no se identificó a los fenoles propuestos con actividad alelopática reportados previamente en *Phragmites*, así como otros fenoles.

Contrario a estos resultados, en otros estudios se determinó la presencia de fenoles simples a partir de extracciones con acetato de etilo o incluso con hexano (Wang et al., 2010; Wu et al., 2013, Zhang et al., 2015b). La elección como disolvente de trabajo al metanol (MeOH) para la obtención de extractos y su análisis, estuvo basado en los resultados preliminares del contenido de FT entre este disolvente y los otros dos (AcOEt y DCM). Cabe mencionar que se realizaron pruebas presuntivas de la presencia de estos seis fenoles en los extractos con AcOEt y DCM, en los cuales tampoco se encontraron. Por lo que se sugiere que la macrofita *Phragmites* utilizada en este estudio y la cual es nativa de la región del Centro de México (Colin y Eguiarte 2016), no produce estos fenoles en cantidad cuantificable a diferencia de las especies analizadas en otras regiones, en donde se les atribuye el efecto alelopático a este tipo de compuestos (Li y Hu 2005; Zhou et al., 2006; Nakai et al., 2010; Cao et al., 2008; Uddin et al., 2012, 2014, 2017) o incluso como en otras macrofitas (Smolders et al., 2000; Körner y Nicklisch 2002; Erhard y Gross 2006; Nakai et al., 2012; Wu et al., 2013).

7.4 Efecto de *Phragmites australis* ambiental crecida en el embalse de Valle de Bravo

La presencia recurrente de floraciones de cianobacterias tóxicas en el embalse de Valle de Bravo (Alillo-Sánchez et al., 2014; Valeriano-Riveros et al., 2014; Nandini et al., 2019; Arias-Rodriguez et al., 2020) reduce la diversidad ecológica, alterando la dinámica ecológica entre los eslabones tróficos (Wiegand y Pflugmacher, 2005; Graneli et al., 2008; Heisler et al., 2008). Asimismo, el uso del agua en el embalse tiene un propósito recreacional, de cultivo y para tratamiento de potabilización, por lo que esta situación también es considerada como un problema de salud pública, debido a la ingesta de agua con presencia de neurotoxinas, hepatotoxinas o dermatoxinas por diversos vectores directos o indirectos con consecuencia crónica o letal para el humano (Meriluoto et al., 2005; Merel et al., 2013; Corbel et al., 2014). La implementación y evaluación de sistemas biológicos como las IFM en este cuerpo de agua pueden contribuir en el conocimiento sobre las estrategias aplicadas en el embalse con potencial de rehabilitación de este gran cuerpo de agua (Nakamura y Mueller, 2008; Borne et al., 2013; Afzal et al., 2019).

La macrófita bajo crecimiento ambiental como PhgA y su capacidad potencial de reducir la proliferación de algas y cianobacterias, se inicia esta sección describiendo la condición del embalse con relación a las variables ambientales y la presencia de estos organismos autótrofos, posteriormente se explica el efecto que la IFM presentó sobre estas poblaciones. En el embalse de Valle de Bravo se mantuvo la dominancia de las cianobacterias durante todo el período de estudio, así como el predominio de las diatomeas. Ambos grupos del fitoplancton sobre los demás grupos algales. La presencia de estos dos grupos principales

puede asociarse a aspectos coevolutivos, aprovechando de manera similar la disponibilidad de los factores ambientales, entre los que la concentración de nutrientes y la temperatura son los principales promotores de su crecimiento (Janson, 2002; Lüring et al., 2013; Schindler et al., 2016).

A partir de los datos en el sitio control, se observó que prevalecen las condiciones de eutrofización en el embalse, con una variación estacional durante la temporada de secas con el aumento de NO_3^- y menor temperatura, mientras que en la temporada de lluvias se observó un comportamiento contrario. El PO_4^{3-} no mostró variación estacional, pero se observó una tendencia de aumento sostenido durante el período de estudio. Se encontró que el NO_3^- fue el factor limitante para las diatomeas, mientras que el PO_4^{3-} y la temperatura para las cianobacterias. En Valle de Bravo cuando las concentraciones de NO_3^- fueron altas y las de PO_4^{3-} bajas, las diatomeas incrementaron sus densidades. De forma contraria cuando el NO_3^- disminuyó, y el PO_4^{3-} y la temperatura aumentaron, las diatomeas disminuyeron su abundancia, y que a su vez se registró un aumento de las cianobacterias. De manera que esta dimanica entre ambos grupos del fitoplancton con los factores ambientales ha sido mencionada previamente (Hilton, 2014; Arias-Rodriguez et al., 2020; Mesquita et al., 2020).

En el embalse de Valle de Bravo, la presencia estacional entre diatomeas y cianobacterias estuvo asociada a la temperatura del agua registrada durante los dos años del estudio. En el caso de las cianobacterias, su crecimiento es favorecido por las temperaturas cálidas ($> 17^\circ$

C), mientras que las diatomeas proliferan en aguas templadas a frías ($< 17^{\circ} \text{C}$) (van der Grinten et al., 2005; Mesquita et al., 2020).

En los resultados, la biomasa de cianobacterias representada indirectamente como ficocianina mostró una variación estacional similar al pH y la temperatura, pero fue opuesta al comportamiento de la turbidez y NO_3^- . Esta respuesta de las cianobacterias a la disponibilidad de NO_3^- a primera vista parecería contradictoria con los factores que promueven su proliferación (Lüring et al., 2013; Schindler et al., 2016). Sin embargo, en este estudio, el aumento sostenido de PO_4^{3-} se presentó cuando hubo una baja concentración de NO_3^- , por lo que el crecimiento de las cianobacterias se mantuvo durante la sucesión de estos nutrientes, tal y como se ha observado en otros sistemas acuáticos donde la disponibilidad tanto de nitrógeno como de fósforo promueven la presencia de floraciones de cianobacterias (Davis et al., 2010; Jankowiak et al., 2019).

Con respecto a la abundancia de cianobacterias, se registró que la microcistina E-MC e I-MC mostraron una tendencia en la variación estacional similar a la ficocianina y la temperatura. Esto sugiere una relación con el crecimiento celular y la biosíntesis de toxinas (Neilan et al., 2013); sin embargo, las variables biológicas de la microcistina fueron opuestas al comportamiento del NO_3^- . Esto puede deberse al papel que juega el N, que en condiciones limitantes activa los genes involucrados en la síntesis de estas toxinas (microcystin biosynthesis genes, *mcy*), aumentando su concentración, mientras que en condiciones de alta disponibilidad de N estos genes se apagan reduciendo la cantidad de toxina (Flores et al., 2008; Gobler et al., 2016; Pimentel y Giani, 2014). La relación

encontrada entre microcistinas y ficocianina fue proporcional al biovolumen de cianobacterias y a la cantidad de toxinas. Por lo que con estos valores consideramos que durante la época de lluvias el riesgo potencial por presencia de cianotoxinas es mayor para el uso y manejo del agua. Sin embargo, los niveles registrados tanto de E-MC como de I-MC no excedieron las guías de la OMS (World Health Organization, 1998) de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para el uso de agua recreativa.

Por otra parte, se encontró la presencia de cinco especies de cianobacterias predominantes por su biovolumen con relación a las variables ambientales evaluadas. En el caso de *A. yezoense*, esta cianobacteria estuvo presente en ambas temporadas de secas cuando se registraron las altas concentraciones de NO_3^- , incluso en las bajas temperaturas de la temporada; en contraparte de la menor densidad celular de *M. aeruginosa* y *P. agardhii*, principalmente en la segunda temporada de secas en C-II. En temporada de lluvias, *A. yezoense* redujó su abundancia y se registró el incremento de cianobacterias como *D. planctonicum*, *M. aeruginosa* y *P. agardhii*, de manera que se observó que cuando estas tres últimas cianobacterias están presentes, *A. yezoense* mantuvo bajo su biovolumen.

Asimismo, se encontró que el PO_4^{3-} estuvo asociado a las cianobacterias *D. planctonicum* y *P. agardhii*, a diferencia del NO_3^- . Estos resultados pueden ser explicados a lo observado en otros estudios ambientales, donde el PO_4^{3-} estimula la proliferación de cianobacterias fijadoras de nitrógeno que complementan sus requerimientos de N a través de la fijación y transformación del N atmosférico, a la vez que aprovechan el aumento de los niveles de P (Sabour et al., 2009; Herrero y Flores, 2019).

Con base en lo anterior, en este estudio cuatro de las cinco especies de cianobacterias con mayor incidencia fueron diazotróficas, por lo que al incrementar los PO_4^{3-} , se registró un aumento de estas cianobacterias, mientras que no fue así con el NO_3^- . Cuando aumentaron los NO_3^- estas cianobacterias diazotróficas tampoco aumentaron su densidad celular, asimismo cuando disminuyeron los NO_3^- , estas no decayeron. Por lo que sugerimos que los NO_3^- mantuvieron la densidad celular alcanzada previamente con alta disponibilidad de los PO_4^{3-} .

De acuerdo a los resultados obtenidos la presencia de grupos tóxicos dominantes de cianobacterias como *A. yezoense*, *D. planctonicum*, *P. agardhii* y *P. mucicola* difieren en comparación con los registrados en estudios anteriores en el embalse, cuyos grupos dominantes fueron *Nostoc* y *Oscillatoria* (García et al., 2002; Gaytán-Herrera et al., 2011; Alillo-Sánchez et al., 2015). De esta forma se observó una dinámica estacional de la presencia de cianobacterias tóxicas que muestra distintas especies registradas a lo largo de los casi 20 años de estudio en el embalse. Estas variaciones entre especies dominantes se presentan en otros cuerpos de agua eutróficos en diferentes países, por lo que se sugiere la existencia de patrones temporales de dominancia por grupos específicos de cianobacterias y que puede cambiar debido al actual incremento en la temperatura y disponibilidad de nutrientes (Cook et al., 2004; Duong et al., 2013; Wynne y Stumpf, 2015; Hayes et al., 2020).

Comprender el momento en el que se presentan las floraciones de cianobacterias tóxicas puede ayudar en la planificación por parte de las comunidades locales y los administradores

gubernamentales de los recursos para la implementación de estrategias en la rehabilitación de los sistemas hídricos. Por lo que la implementación de macrofitas en islas flotantes tiene como propósito la reducción de nutrientes en el sistema acuático (Chang et al., 2017; Lucke et al., 2019) y consecuentemente a la reducción del fitoplancton (West et al. 2017; Park et al. 2019). Sin embargo en el modelo IFM empleado en este estudio, no se observaron diferencias en cuanto a la presencia de los diferentes grupos taxonómicos, particularmente entre diatomeas y cianobacterias, por lo que la implementación de la isla mantuvo la diversidad fitoplanctónica en el área monitoreada.

En cuanto a la presencia de cianobacterias en la IFM, se observó que únicamente durante la segunda temporada de lluvias en C-II, hubo una reducción de este grupo. Sin embargo, este efecto no se atribuyó a la presencia de *Phragmites* en la IFM. Durante las tres temporadas restantes se registró un aumento de NO_3^- en el sitio, que coincidió con un aumento de las cianobacterias a pesar de la presencia de la macrófita. Este incremento de los NO_3^- pudo ser debido a que la biomasa cianobacterial representa un potencial reservorio de N y P. Se observó que debajo de la plataforma de la IFM el oleaje del agua fue menor debido a la presencia del rizoma que se extendía a la profundidad de evaluación (velocidad del oleaje no medido), esto se percibió como un microambiente estable donde las cianobacterias permanecían mayor tiempo, incluso se observó que algunas de ellas (no identificadas) estaban adheridas a las raíces de las macrófitas. De este modo las cianobacterias en el sitio que llegan a la senescencia o cuando las floraciones de cianobacterias colapsan, ya sea por su alta densidad celular o por diversos factores ambientales, los componentes celulares entre ellos nutrientes como el N esta disponible en el medio (Zhu et al., 2013; Chen et al., 2018).

En cuanto a los niveles de PO_4^{3-} , estos no mostraron cambios en IFM con respecto al control, sin embargo las correlaciones mostraron mayor asociación de las cianobacterias a la presencia de la IFM que en el sitio control. De este modo se observó como si hubiera una cierta afinidad entre ambos niveles taxonómicos. El establecimiento de cianobacterias en este sitio se puede explicar por el hecho de que el sistema radicular de *Phragmites* aporta oxígeno al medio y moviliza verticalmente nutrientes como el N, modificando su solubilidad, lo que atrae a otros microorganismos (Hubbard, 2010; Li et al., 2014a; Ge et al., 2017) y en este caso, posiblemente a las cianobacterias. Por otro lado, la IFM redujo la concentración de microcistinas, particularmente E-MC durante la temporada de lluvias. Esta disminución pudo deberse a la asimilación y transformación de microcistina que presentan algunas macrófitas, incluyendo *P. australis* (Pflugmacher et al., 2001; Nimptsch et al., 2008; Romero-Oliva et al., 2015; Cao et al., 2019).

El estudio mostró que durante la temporada de secas en C-I cuando los niveles de NO_3^- fueron más altos en el sitio IFM hubo una disminución de la cianobacteria *A. yezoense*, por lo que no se correlacionó con este nutriente, en comparación a lo observado en el control.

En el caso de *M. aeruginosa*, se observó en el sitio IFM que la variación en su abundancia tuvo un comportamiento anual, ya que en C-I en las temporadas de secas y lluvias hubo un mayor biovolumen que en control. El incremento de *M. aeruginosa*, como se observa en el CCA, estuvo asociado al NO_3^- pero no destacó como especie dominante debido a que presentó bajas densidades, mientras que *A. yezoense* incrementó su biovolumen, probablemente debido a la fijación de N atmosférico cuando las concentraciones de NO_3^- son escasas (Ferber et al., 2004; Rolff et al., 2007). Esto sugiere una relación entre ambas especies como mutuamente excluyente, la cual pudo estar regulada por la densidad celular.

Por otra parte, en la IFM en la época de lluvias C-II, *M. aeruginosa* mostró una reducción, mientras que *A. yezoense* incrementó, situación que no se observó en el sitio control. De modo que con estos datos se complementa la propuesta en el tipo de relación entre ambas especies, donde *A. yezoense* prolifera en escasa densidad de *M. aeruginosa*. Otra relación mutuamente excluyente en IFM ocurrió entre las especies *D. planctonicum* y *P. mucicola*. Cuando *D. planctonicum* registró un biovolumen menor, *P. mucicola* aumentó su densidad, asimismo se observó que en presencia de la IFM, la cianobacteria *D. planctonicum* redujo su densidad. Por lo que las macrofitas y entre ellas *P. australis* intervienen en la dinámica de sucesión entre las especies de cianobacterias (Triest et al., 2016).

Con base en lo anterior, encontramos que en la IFM aumentaron los NO_3^- y no tuvo efecto sobre los PO_4^{3-} . Como se ha registrado en *Phragmites*, esta macrofita es capaz de enriquecer el medio por su aporte de N (Ge et al., 2017), pero estos resultados no son consistentes con otros modelos de islas flotantes probados donde se eliminan estos nutrientes (Abed et al., 2017; Wang et al., 2019).

La implementación de macrofitas con el propósito de mejorar la calidad del agua en pequeños cuerpos de agua o utilizadas en humedales artificiales para el tratamiento local de aguas residuales, han resultado ser capaces de disminuir el exceso de nutrientes, así como la densidad del fitoplancton, asimilar metales pesados y reducir la turbiedad del agua haciéndola más clara (Šantrůčková et al., 2010; Zhang et al., 2015a). Sin embargo, en estudios donde las IFM son colocadas en cuerpos de agua de grandes dimensiones, es difícil observar claramente la capacidad de las macrofitas para reducir tanto los nutrientes

como las altas densidades de algas (Urakawa et al., 2017; Park et al., 2019; Gao et al., 2019). Como lo observado en este trabajo, la introducción de macrofitas a un gran sistema hídrico interactuó de manera compleja con las especies de cianobacterias, i) al incrementar la disponibilidad del nitrógeno se presentó el crecimiento de algunas especies de cianobacteria, ii) al encontrar relaciones mutuamente excluyentes entre cianobacterias en el sitio de la IFM, sugerimos que *Phragmites* tuvo un papel ecológico mediador en la relación entre cianobacterias y iii) *Phragmites* al reducir la microcistina posiblemente favoreció el establecimiento e interacción de cianobacterias tóxicas, que en ausencia de la macrofita no llegan a cohabitar, como sucedió en el sitio control. Con base en estos resultados aún queda por dilucidar en investigaciones futuras, la interacción entre macrofita y cada una de las especies de cianobacterias en grandes sistemas de agua, ya que el sistema radicular de las macrofitas se vuelve un hábitat en el cual se establecen nuevas interacciones.

En México el uso de las IFM en la rehabilitación de cuerpos de agua es escaso (Olguín et al., 2017) y su implementación en grandes cuerpos de agua es ausente, por lo que el presente trabajo aporta información sobre el efecto de los modelos de IFM para su uso posterior en otros sistemas hídricos en México. En trabajos posteriores se puede considerar introducir un mayor número de islas para observar una reducción clara de las poblaciones del fitoplancton. Tomando en cuenta el uso extendido de estas plataformas vegetales en países como Japón, China, Inglaterra, Alemania, Corea y Taiwán, las IFM pueden llegar a cubrir entre el 10 al 30% de la superficie del cuerpo de agua, notándose el efecto de reducción del fitoplancton. El costo aproximado por m² en la construcción de un modelo IFM es de 50 dólares y de 0.00026 dólares por m³ de agua tratada (Nakamura y Mueller, 2008; Afzal et al., 2019), en comparación a los 850 euros por m³ de agua tratada mediante

un sistema convencional que incluye procesos fisicoquímicos, de filtración y desinfección (Iglesias et al., 2017). Por lo que los sistemas de tratamiento de agua con macrofitas resultan ser una ecotecnología apropiada para la limpieza a gran escala de aguas en sistemas naturales, aguas residuales y aguas residuales industriales (Chang et al., 2017; West et al. 2017; Lucke et al., 2019).

8. CONCLUSIONES

En la macrofita *Phragmites* se determinó que el contenido de FT como indicador potencial de alelopatía fue mayor en condiciones de crecimiento ambiental como PhgA en comparación con las condiciones de laboratorio como PhgL. La estructura vegetal de la hoja presentó mayor concentración de FT que el tallo y el rizoma. El efecto alelopático de *Phragmites* en PhgL, mostró que la cianobacteria *M. aeruginosa* fue menos sensible a la exposición de los extractos (inhibición de 22% - 24% a 10 mg y 17% - 24% a 20 mg, en el día 2 y 4 del ensayo) que el alga *T. obliquus* (inhibición de 57% - 49% a 10 mg y 20% - 57% en el día 2 y 4 del ensayo). Sin embargo, se sugiere que este efecto no fue primordialmente atribuido a los fenoles, ya que su distribución en cuanto a la morfología de la macrofita no mostró diferencia entre el contenido de FT y el efecto de inhibición. De los seis fenoles propuestos como compuestos alelopáticos presentes en *Phragmites*, únicamente se encontró el ácido benzoico como compuesto volátil mediante SPME-GC-MS en muestras frescas de hoja y tallo. En cambio, en los extractos metanólicos de hoja, tallo, rizoma y exudado estos fenoles no se detectaron. Por otra parte, PhgA en el embalse de Valle de Bravo, mostró un incremento de los NO_3^- , mientras que no se observó efecto para los PO_4^{3-} . No se presentaron variaciones de los diferentes grupos taxonómicos de fitoplancton por la presencia de *Phragmites* en la IFM, por lo que el grupo de cianobacterias no disminuyó. Sin embargo, la concentración de microcistina extracelular fue menor durante la temporada de lluvias en el segundo ciclo anual (C-II), mientras que la toxina intracelular lo fue en temporada de secas de C-II. Se observó que cuando estuvo presente PhgA hubo un incremento de la cianobacteria *M. aeruginosa*, a su vez que se registró una disminución de la densidad celular de *D. planctonicum*. La presencia de PhgA

tuvo efecto sobre la sucesión de las especies de cianobacterias a través de la variación de los factores ambientales como el NO_3^- , el cual estuvo asociado con *A. yezoense*, mientras que se encontró asociación de la temperatura con *M. aeruginosa*. Los PO_4^{3-} mostraron estar relacionados con la presencia de las otras tres cianobacterias diazotróficas. También se observó una relación mutuamente excluyente por un lado entre *M. aeruginosa* y *A. yezoense* y por otro entre *D. planctonicum* y *P. mucicola*.

9. PERSPECTIVAS

Estos resultados corresponden a un efecto vertical por la presencia de PhgA en un modelo de isla flotante en el embalse de Valle de Bravo, el cual es un gran sistema hídrico eutrófico, por lo que realizar una rehabilitación ecológica utilizando estas estructuras implicaría incrementar el número de islas flotantes y profundizar en las interacciones macrofitas-cianobacterias, considerando también el efecto alelopático entre especies del fitoplancton.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abed, S. N., Almuktar, S. A., & Scholz, M. (2017). Remediation of synthetic greywater in mesocosm—scale floating treatment wetlands. *Ecological engineering*, 102, 303-319.
- Addisie, Y., & Medellin, A. C. (2012). Allelopathy in aquatic macrophytes: Effects on growth and physiology of phytoplankton. *African Journal of Plant Science*, 6(10), 270-276.
- Afzal, M., Arslan, M., Müller, J. A., Shabir, G., Islam, E., Tahseen, R., & Khan, Q. M. (2019). Floating treatment wetlands as a suitable option for large-scale wastewater treatment. *Nature Sustainability*, 2(9), 863-871.
- Alillo-Sánchez, J. L., Gaytán-Herrera, M. L., Martínez-Almeida, V. M., & Ramírez-García, P. (2014). Microcystin-LR equivalents and their correlation with *Anabaena* spp. in the main reservoir of a hydraulic system of Central Mexico. *Inland Waters*, 4(3), 327-336.
- Anaya, A. L. (2003). Alelopatía. *Ecología Química. Plaza y Valdés*, 255-298, México.
- Ando, D., Fujisawa, T., & Katagi, T. (2015). Uptake, translocation, and metabolism of phenols by submerged rooted macrophyte, water milfoil (*Myriophyllum elatinoides*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(21), 5189-5195.
- Ansari, A. A. (2016). *Phytoremediation*. S. S. Gill, R. Gill, G. Lanza, & L. Newman. Springer International Publishing.
- Arias-Rodriguez, L. F., Duan, Z., Sepúlveda, R., Martinez-Martinez, S. I., & Disse, M. (2020). Monitoring water quality of Valle de Bravo reservoir, Mexico, Using entire lifespan of MERIS data and machine learning approaches. *Remote Sensing*, 12(10), 1586.
- Armstrong, J., & Armstrong, W. (1999). Phragmites die-back: Toxic effects of propionic, butyric and caproic acids in relation to pH. *New Phytologist*, 142(2), 201-217.
- Aslan, S., & Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1), 64-70.
- Avendaño Rivera, P. A., & Espinoza, G. (2018). Producción de agua residual sintética como candidato a material de referencia en los parámetros de pH, sólidos suspendidos totales y demanda química de oxígeno (Doctoral dissertation).
- Baird, R. B., Eaton, A. D., & Clesceri, L. S. (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 10. E. W. Rice. Washington, DC.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233-266.
- Bajpai, V., Singh, A., Kumar, B., & Madhusudanan, K. P. (2018). Application of DART-MS in natural phytochemical research. *Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry: Principles and practices of DART-MS*, 255-290.
- Bakker, E. S., Van Donk, E., Declerck, S. A. J., Helmsing, N. R., Hidding, B., & Nolet, B. A. (2010). Effect of macrophyte community composition and nutrient enrichment on plant biomass and algal blooms. *Basic and Applied Ecology*, 11(5), 432-439.
- Barnes, R. S. K., & Mann, K. H. (2009). *Fundamentals of aquatic ecology*. John Wiley & Sons.
- Benke, P. I., Kumar, M. V., Pan, D., & Swarup, S. (2015). A mass spectrometry-based unique fragment approach for the identification of microcystins. *Analyst*, 140(4), 1198-1206.
- Bhadoria, P. B. S. (2011). Allelopathy: a natural way towards weed management. *Journal of Experimental Agriculture International*, 7-20.

- Blum, U. (2019). General background for plant-plant allelopathic interactions. In *Plant-Plant Allelopathic Interactions*, 2, 27-48. Springer, Cham.
- Bolser, J. A., Alan, R. R., Smith, A. D., Li, L., Seeram, N. P., & McWilliams, S. R. (2013). Birds select fruits with more anthocyanins and phenolic compounds during autumn migration. *The Wilson Journal of Ornithology*, 125(1), 97-108.
- Borne, K. E., Tanner, C. C., & Fassman-Beck, E. A. (2013). Stormwater nitrogen removal performance of a floating treatment wetland. *Water Science and Technology*, 68(7), 1657-1664.
- Březinová, T. D., & Vymazal, J. (2018). Phenolic compounds in wetland macrophytes. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 49(1), 1-8.
- Burkholder, J. M., Shumway, S. E., & Glibert, P. M. (2018). Food web and ecosystem impacts of harmful algae. *Harmful Algal Blooms*, 243-336.
- Cao, Q., Wan, X., Shu, X., & Xie, L. (2019). Bioaccumulation and detoxication of microcystin-LR in three submerged macrophytes: The important role of glutathione biosynthesis. *Chemosphere*, 225, 935-942.
- Cao, T., Xie, P., Ni, L., Wu, A., Zhang, M., & Xu, J. (2008). Relationships among the contents of total phenolics, soluble carbohydrate, and free amino acids of 15 aquatic macrophytes. *Journal of Freshwater Ecology*, 23(2), 291-296.
- Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(6), 445-459.
- Carmichael, W. W. (1997). The cyanotoxins. *Advances in Botanical Research*, 27, 211-256.
- Chang, X., Eigemann, F., & Hilt, S. (2012). Do macrophytes support harmful cyanobacteria? Interactions with a green alga reverse the inhibiting effects of macrophyte allelochemicals on *Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae*, 19, 76-84.
- Chang, Y., Cui, H., Huang, M., & He, Y. (2017). Artificial floating islands for water quality improvement. *Environmental Reviews*, 25(3), 350-357.
- Chen, B. M., Liao, H. X., Chen, W. B., Wei, H. J., & Peng, S. L. (2017). Role of allelopathy in plant invasion and control of invasive plants. *Allelopathy Journal*, 41, 155-166.
- Chen, J., Li, L., Zhang, H., & Liu, Z. (2011). Inhibitory effect of *Arundo donax* and *Nymphaea tetragona* on *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Science & Technology*, 34(7), 35-82.
- Chen, M., Ding, S., Chen, X., Sun, Q., Fan, X., Lin, J., & Zhang, C. (2018). Mechanisms driving phosphorus release during algal blooms based on hourly changes in iron and phosphorus concentrations in sediments. *Water Research*, 133, 153-164.
- Cheng, A. X., Lou, Y. G., Mao, Y. B., Lu, S., Wang, L. J., & Chen, X. Y. (2007). Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(2), 179-186.
- Choi, S. E., Yoon, J. H., Choi, H. K., & Lee, M. W. (2009). Phenolic compounds from the root of *Phragmites communis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(6), 893-895.
- Chou, C. H. (1999). Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(5), 609-636.
- Christoffersen, K. (1996). Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia*, 35(sup6), 42-50.
- Colin, R., & Eguiarte, L. E. (2016). Phylogeographic analyses and genetic structure illustrate the complex evolutionary history of *Phragmites australis* in Mexico. *American Journal of Botany*, 103(5), 876-887.

- Colin, R., & Eguiarte, L. E. (2020). Genetic and ecological characterization of the invasive wetland grasses *Arundo donax* and *Phragmites australis* in the Cuatro Ciénegas Basin. In *Plant Diversity and Ecology in the Chihuahuan Desert*, 241-263. Springer, Cham.
- Comas, A. (1996). Las Chlorococcales dulciacuícolas de Cuba. [The freshwater Chlorococoids of Cuba.] Stuttgart: J. Cramer, 192, il. Bibliotheca Phycologica.
- Connor, A. M., Luby, J. J., Tong, C. B., Finn, C. E., & Hancock, J. F. (2002). Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among blueberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(1), 89-97.
- Cook, C. M., Vardaka, E., & Lanaras, T. (2004). Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters, 1987—2000: occurrence, toxicity, and impacts in the mediterranean region. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 32(2), 107-124.
- Corbel, S., Mougin, C., & Bouaïcha, N. (2014). Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. *Chemosphere*, 96, 1-15.
- Cronberg, G., & Annadotter, H. (2006). Manual on aquatic cyanobacteria: A photo guide and a synopsis of their toxicology. Intergovernmental Oceanographic Commission, UNESCO.
- Cronin, G., & Lodge, D. M. (2003). Effects of light and nutrient availability on the growth, allocation, carbon/nitrogen balance, phenolic chemistry, and resistance to herbivory of two freshwater macrophytes. *Oecologia*, 137(1), 32-41.
- Cutler, H. G., & Cutler, S. J. (1999). Biologically active natural products: Agrochemicals. CRC Press. EEUU.
- Dash, M. C., & Mahanta, J. K. (1993). Quantitative analysis of the community structure of tropical amphibian assemblages and its significance to conservation. *Journal of Biosciences*, 18(1), 121-139.
- Davidson, K., Gowen, R. J., Tett, P., Bresnan, E., Harrison, P. J., McKinney, A., & Crooks, A. M. (2012). Harmful algal blooms: how strong is the evidence that nutrient ratios and forms influence their occurrence? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 399-413.
- Davis, T. W., Harke, M. J., Marcoval, M. A., Goleski, J., Orano-Dawson, C., Berry, D. L., & Gobler, C. J. (2010). Effects of nitrogenous compounds and phosphorus on the growth of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacterial blooms. *Aquatic Microbial Ecology*, 61(2), 149-162.
- Dhingra, R., & Ahluwalia, A. S. (2007). Cyanobacterial blooms in ponds of Punjab, India. *Vegetos*, 20(1), 79-82.
- Duke, S. O. (2003). Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, 217(4), 529-539.
- Duong, T. T., Le, T. P. Q., Dao, T. S., Pflugmacher, S., Rochelle-Newall, E., Hoang, T. K., & Dang, D. K. (2013). Seasonal variation of cyanobacteria and microcystins in the Nui. Coc reservoir, Northern Vietnam. *Journal of Applied Phycology*, 25(4), 1065-1075.
- Einhellig, F. A. (1995). Allelopathy: Current status and future goals. In *Allelopathy*, 1-24. Springer Netherlands.
- Erhard, D. (2006). Allelopathy in aquatic environments. In *Allelopathy*, 433-450. Springer Netherlands.
- Erhard, D., & Gross, E. M. (2006). Allelopathic activity of *Elodea canadensis* and *Elodea nuttallii* against epiphytes and phytoplankton. *Aquatic Botany*, 85(3), 203-211.
- Falconer, I. R., & Humpage, A. R. (2006). Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 21(4), 299-304.

- Farooq, N., Abbas, T., Tanveer, A., & Jabran, K. (2020). Allelopathy for weed management. *Co-evolution of Secondary Metabolites*, 505-519.
- Ferber, L. R., Levine, S. N., Lini, A., & Livingston, G. P. (2004). Do cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen? *Freshwater Biology*, 49(6), 690-708.
- Fischer, N. H., Williamson, G. B., Weidenhamer, J. D., & Richardson, D. R. (1994). In Search of Allelopathy in the Florida Scrub: The Role of Terpenoids. *Journal of Chemical Ecology*, 20(6), 1355-1380.
- Flores, E., Muro-Pastor, A. M., & Meeks, J. C. (2008). Gene transfer to cyanobacteria in the laboratory and in nature. In *The cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*, 45-57.
- Gallardo, M. T., Martin, B. B., & Martin, D. F. (1998). Inhibition of water fern *Salvinia minima* by cattail (*Typha domingensis*) extracts and by 2-chlorophenol and salicylaldehyde. *Journal of Chemical Ecology*, 24(9), 1483-1490.
- Gao, X., Wang, Y., Sun, B., & Li, N. (2019). Nitrogen and phosphorus removal comparison between periphyton on artificial substrates and plant-periphyton complex in floating treatment wetlands. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(21), 21161-21171.
- Gao, Y. N., Liu, B. Y., Xu, D., Zhou, Q. H., Hu, C. Y., Ge, F. J., & Wu, Z. B. (2011). Phenolic compounds exuded from two submerged freshwater macrophytes and their allelopathic effects on *Microcystis aeruginosa*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(5).
- García, P. R., Nandini, S., Sarma, S. S. S., Valderrama, E. R., Cuesta, I., & Hurtado, M. D. (2002). Seasonal variations of zooplankton abundance in the freshwater reservoir Valle de Bravo (Mexico). *Hydrobiologia*, 467(1), 99-108.
- Gawronska, H., & Golisz, A. (2006). Allelopathy and biotic stresses. In *Allelopathy*, 211-227. Springer, Netherlands.
- Gaytan-Herrera, M. L., Martínez-Almeida, V., Oliva-Martínez, M. G., Duran-Díaz, A., & Ramírez-García, P. (2011). Temporal variation of phytoplankton from the tropical reservoir Valle de Bravo, Mexico. *Journal of Environmental Biology*, 32(1), 117-126.
- Ge, Z., An, R., Fang, S., Lin, P., Li, C., Xue, J., & Yu, S. (2017). *Phragmites australis* + *Typha latifolia* community enhanced the enrichment of nitrogen and phosphorus in the soil of Qin Lake Wetland. *Scientifica*, 2017.
- Gette-Bouvarot, M., Mermillod-Blondin, F., Lemoine, D., Delolme, C., Danjean, M., Etienne, L., & Volatier, L. (2015). The potential control of benthic biofilm growth by macrophytes - A mesocosm approach. *Ecological Engineering*, 75, 178-186.
- Gleason, F. K., & Baxa, C. A. (1986). Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on eukaryotic microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 33(1), 85-88.
- Gobler, C. J., Burkholder, J. M., Davis, T. W., Harke, M. J., Johengen, T., Stow, C. A., & Van de Waal, D. B. (2016). The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54, 87-97.
- Gopal, B., & Goel, U. (1993). Competition and allelopathy in aquatic plant communities. *The Botanical Review*, 59(3), 155-210.
- Graneli, E., Weberg, M., & Salomon, P. S. (2008). Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. *Harmful algae*, 8(1), 94-102.
- Greca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., & Previtiera, L. (1996). Action of antialgal compounds from *Juncus effusus* L. on *Selenastrum capricornutum*. *Journal of Chemical Ecology*, 22(3), 587-603.

- Greca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Pinto, G., Previtera, L., & Zarrelli, A. (2001). Synthesis and antialgal activity of dihydrophenanthrenes and phenanthrenes II: Mimics of naturally occurring compounds in *Juncus effusus*. *Journal of Chemical Ecology*, 27(2), 257-271.
- Greca, M., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L., & Sorrentino, M. (1998). Antialgal phenylpropane glycerides from *Juncus effusus*. *Natural Product Letters*, 12(4), 263-270.
- Greca, M., Monaco, P., Previtera, L., Aliotta, G., Pinto, G., & Pollio, A. (1989). Allelochemical activity of phenylpropanes from *Acorus gramineus*. *Phytochemistry*, 28(9), 2319-2321.
- Gross, E. M. (2003). Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(3-4), 313-339.
- Gross, E. M., Legrand, C., Rengefors, K., & Tillmann, U. (2012). Allelochemical interactions among aquatic primary producers. *Chemical Ecology in Aquatic Systems*, 196-209.
- Grossman, A. R., & Aksoy, M. (2015). Algae in a phosphorus-limited landscape. *Annual Plant Reviews, Phosphorus Metabolism in Plants*, 48, 337.
- Grutters, B. M., Saccomanno, B., Gross, E. M., Van de Waal, D. B., van Donk, E., & Bakker, E. S. (2017). Growth strategy, phylogeny and stoichiometry determine the allelopathic potential of native and non-native plants. *Oikos*, 126(12), 1770-1779.
- Harke, M. J., Berry, D. L., Ammerman, J. W., & Gobler, C. J. (2012). Molecular response of the bloom-forming cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*, to phosphorus limitation. *Microbial Ecology*, 63(1), 188-198.
- Harrison, M. M., Tyler, A. C., Hellquist, C. E., & Pagano, T. (2017). Phenolic content of invasive and non-invasive emergent wetland plants. *Aquatic Botany*, 136, 146-154.
- Hasler, A. D., & Jones, E. (1949). Demonstration of the antagonistic action of large aquatic plants on algae and rotifers. *Ecology*, 30(3), 359-364.
- Hayes, N. M., Haig, H. A., Simpson, G. L., & Leavitt, P. R. (2020). Effects of lake warming on the seasonal risk of toxic cyanobacteria exposure. *Limnology and Oceanography Letters*, 5(6), 393-402.
- Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., & Suddleson, M. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae*, 8(1), 3-13.
- Herrero, A., & Flores, E. (2019). Genetic responses to carbon and nitrogen availability in *Anabaena*. *Environmental Microbiology*, 21(1), 1-17.
- Hilt, S., & Gross, E. M. (2008). Can allelopathically active submerged macrophytes stabilise clear-water states in shallow lakes? *Basic and Applied Ecology*, 9(4), 422-432.
- Hilton, J. A. (2014). Ecology and evolution of diatom-associated cyanobacteria through genetic analyses, Doctoral dissertation.
- Hong, Y., Huang, J. J., & Hu, H. Y. (2009). Effects of a novel allelochemical ethyl 2-methylacetoacetate (EMA) on the ultrastructure and pigment composition of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(4), 502-508.
- Hootsmans, M. J. M., & Blindow, I. (1994). Allelopathic limitation of algal growth by macrophytes. In *Lake Veluwe, a macrophyte-dominated system under eutrophication stress*, 175-192. Springer, Dordrecht.

- Horppila, J., & Nurminen, L. (2001). The effect of an emergent macrophyte (*Typha angustifolia*) on sediment resuspension in a shallow north temperate lake. *Freshwater Biology*, 46(11), 1447-1455.
- Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2010). Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10576-10581.
- Hu, H., & Hong, Y. (2008). Algal-bloom control by allelopathy of aquatic macrophytes - a review. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 2(4), 421-438.
- Hubbard, R. K. (2010). Floating vegetated mats for improving surface water quality. In *Emerging Environmental Technologies*, 2, 211-244. Springer, Dordrecht.
- Huber-Pestalozzi, G. (1962). Das phytoplankton des Süßwassers. Systematik und biologie. Die Binnengewässer. Bd 16/3. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche, 606.
- Huber-Pestalozzi, G. 1968. Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie. 3. Teil: Cryptophyceae, Chloromonadophyceae, Dinophyceae. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), 322. Germany.
- IAS – International Allelopathy Society. 1996. Constitution and Bylaw of IAS. Cádiz-Spain, IAS Newsletter.
- Iglesias, R., Simón, P., Moragas, L., Arce, A., & Rodriguez-Roda, I. (2017). Cost comparison of full-scale water reclamation technologies with an emphasis on membrane bioreactors. *Water Science and Technology*, 75(11), 2562-2570.
- Inderjit, D. K., & Dakshini, K. M. M. (1995). On laboratory bioassays in allelopathy. *The Botanical Review*, 61(1), 28-44.
- Inderjit. (1996). Plant phenolics in allelopathy. *The Botanical Review*, 186-202.
- Jakubaszek, A. (2021). Nitrogen and phosphorus accumulation in horizontal subsurface flow constructed wetland. *Agronomy*, 11(7), 1317.
- Jankowiak, J., Hattenrath-Lehmann, T., Kramer, B. J., Ladds, M., & Gobler, C. J. (2019). Deciphering the effects of nitrogen, phosphorus, and temperature on cyanobacterial bloom intensification, diversity, and toxicity in western Lake Erie. *Limnology and Oceanography*, 64(3), 1347-1370.
- Janson, S. (2002). Cyanobacteria in symbiosis with diatoms. In *Cyanobacteria in Symbiosis*, 1-10. Springer, Dordrecht.
- Jüttner, F. (1999). Allelochemical control of natural photoautotrophic biofilms. *Special Publications of the Royal Society of Chemistry*, 242, 43-50.
- Kaebnick, M., Neilan, B. A., Börner, T., & Dittmann, E. (2000). Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3387-3392.
- Kala, H. K., Mehta, R., Tandey, R., Sen, K. K., & Mandal, V. (2016). Ten years of research on phenolics (2005–2015): A status report. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, 18(1), 1-4.
- Kenefick, S. L., Hrudey, S. E., Peterson, H. G., & Prepas, E. E. (1993). Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Water Science and Technology*, 27(3-4), 433-440.
- Khalaf, R. A., Alhusban, A. A., Al-Shalabi, E., Al-Sheikh, I., & Sabbah, D. A. (2019). Isolation and structure elucidation of bioactive polyphenols. *Studies in Natural Products Chemistry*, 63, 267-337.
- Kim, Y. O., & Lee, E. J. (2011). Comparison of phenolic compounds and the effects of invasive and native species in East Asia: support for the novel weapons hypothesis. *Ecological Research*, 26(1), 87-94.

- Komárek J. (2003). Problem of the taxonomic category “species” in cyanobacteria. *Archiv fuer Hydrobiologie / Algological studies*, 109, 281–297.
- Komárek, J. (1983). Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung: Chlorococcales. *Das Phytoplankton des Süßwassers. Systematik und Biologie*, 7.
- Komárek, J., & Anagnostidis, K., 1999. Cyanoprokaryota I Teil Chroococcales. In: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., Mollenhauer, D. (Eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, 19(1), 1-548. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Kong, C. H., Zhang, S. Z., Li, Y. H., Xia, Z. C., Yang, X. F., Meiners, S. J., & Wang, P. (2018). Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals. *Nature Communications*, 9(1), 1-9.
- Körner, S., & Nicklisch, A. (2002). Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *Journal of Phycology*, 38(5), 862-871.
- Kótai, J. 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norwegian Institute for Water Research B-11/69.
- Lam, K. C., Ibrahim, R. K., Behdad, B., & Dayanandan, S. (2007). Structure, function, and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome*, 50(11), 1001-1013.
- Latif, S., Chiapusio, G., & Weston, L. A. (2017). Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defense. *Advances in Botanical Research*, 82, 19-54.
- Lavola, A., Salonen, A., Virjamo, V., & Julkunen-Tiitto, R. (2017). Phytochemical variation in the plant-part specific phenols of wild crowberry (*Empetrum hermaphroditum* Hagerup) populations. *Phytochemistry Letters*, 21, 11-20.
- Leão, P. N., Pereira, A. R., Liu, W. T., Ng, J., Pevzner, P. A., Dorrestein, P. C., & Gerwick, W. H. (2010). Synergistic allelochemicals from a freshwater cyanobacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(25), 11183-11188.
- Leflaive, J., & Ten-Hage, L. (2009). Allelopathic interactions in benthic biofilms: effects of abiotic conditions on production of and sensitivity to allelochemicals. *Journal of the North American Benthological Society*, 28(2), 273-282.
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G. O., & Graneli, E. (2003). Allelopathy in phytoplankton-biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia*, 42(4), 406-419.
- Leishman, M. R., & Thomson, V. P. (2005). Experimental evidence for the effects of additional water, nutrients and physical disturbance on invasive plants in low fertility Hawkesbury Sandstone soils, Sydney, Australia. *Journal of Ecology*, 93(1), 38-49.
- Lemoine, D. G., Barrat-Segretain, M. H., & Roy, A. (2009). Morphological and chemical changes induced by herbivory in three common aquatic macrophytes. *International Review of Hydrobiology*, 94(3), 282-289.
- Lewis Jr, W. M. (1986). Evolutionary interpretations of allelochemical interactions in phytoplankton algae. *The American Naturalist*, 127(2), 184-194.
- Li, F. M., & Hu, H. Y. (2005). Isolation and characterization of a novel anti-algal allelochemical from *Phragmites communis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6545-6553.
- Li, L., Zerbe, S., Han, W., Thevs, N., Li, W., He, P., & Ji, C. (2014a). Nitrogen and phosphorus stoichiometry of common reed (*Phragmites australis*) and its relationship to nutrient availability in northern China. *Aquatic Botany*, 112, 84-90.
- Li, L., Zerbe, S., Han, W., Thevs, N., Li, W., He, P., Schmitt, A., Liu Y., & Ji, C. (2014b). Nitrogen and phosphorus stoichiometry of common reed (*Phragmites australis*) and its relationship to nutrient availability in northern China. *Aquatic Botany*, 112, 84-90.

- Li, Z. H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C. D., & Jiang, D. A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15(12), 8933-8952.
- Liu, S., Zhao, T., Zhu, Y., Qu, X., He, Z., Giesy, J. P., & Meng, W. (2018). Molecular characterization of macrophyte-derived dissolved organic matters and their implications for lakes. *Science of the Total Environment*, 616, 602-613.
- Lopes, L.G., Tavares, G.L., Thomaz, L.D., Sabino, J.R., Borges, K.B., Vieira, P.C., Veiga, T.A.M. & de Souza Borges, W. (2016) Taraxerol 4-Methoxybenzoate, an in vitro inhibitor of photosynthesis isolated from *Pavonia multiflora* A. St-Hil. (Malvaceae). *Chemistry & Biodiversity*, 13, 284-292.
- Lopez-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M. F., Ramirez-Rodriguez, V., & Herrera-Estrella, L. (2000). Organic acid metabolism in plants: From adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 160(1), 1-13.
- Lucke, T., Walker, C., & Beecham, S. (2019). Experimental designs of field-based constructed floating wetland studies: A review. *Science of the Total Environment*, 660, 199-208.
- Lürling, M., Eshetu, F., Faassen, E. J., Kosten, S., & Huszar, V. L. (2013). Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology*, 58(3), 552-559.
- Lyytinen, A., & Lindström, L. (2019). Responses of a native plant species from invaded and uninvaded areas to allelopathic effects of an invader. *Ecology and Evolution*, 9(10), 6116-6123.
- Maberly, S. C., & Gontero, B. (2018). Trade-offs and synergies in the structural and functional characteristics of leaves photosynthesizing in aquatic environments. In *The Leaf: A Platform for Performing Photosynthesis*, 307-343. Springer, Cham.
- Macías, F. A., Galindo, J. L., García-Díaz, M. D., & Galindo, J. C. (2008). Allelopathic agents from aquatic ecosystems: Potential biopesticides models. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 155-178.
- Mallik, A. U. (Ed.). (2002). *Chemical ecology of plants: Allelopathy in aquatic and terrestrial ecosystems*. Springer Science & Business Media.
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 359.
- McCormick, M. K., Kettenring, K. M., Baron, H. M., & Whigham, D. F. (2010). Extent and reproductive mechanisms of *Phragmites australis* spread in brackish wetlands in Chesapeake Bay, Maryland (USA). *Wetlands*, 30(1), 67-74.
- Meiners, S. J., Kong, C. H., Ladwig, L. M., Pisula, N. L., & Lang, K. A. (2012). Developing an ecological context for allelopathy. *Plant Ecology*, 213(8), 1221-1227.
- Men, Y. J., Hu, H. Y., & Li, F. M. (2007). Effects of the novel allelochemical ethyl 2-methylacetoacetate from the reed (*Phragmites australis* Trin) on the growth of several common species of green algae. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 521.
- Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., & Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, 59, 303-327.
- Meriluoto, J., Codd, G., Reilly, M., Metcalf, J. S., Spoof, L., Sjövall, O., & Tarczynska, M. (2005). *TOXIC: cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Åbo Akademi Univ Press. Åbo, Finland.
- Mesquita, M. C., Prestes, A. C. C., Gomes, A. M., & Marinho, M. M. (2020). Direct effects of temperature on growth of different tropical phytoplankton species. *Microbial Ecology*, 79(1), 1-11.

- Meuleman, A. F., Beekman, J. H. P., & Verhoeven, J. T. (2002). Nutrient retention and nutrient-use efficiency in *Phragmites australis* stands after wastewater application. *Wetlands*, 22(4), 712-721.
- Milke, J., Gałczyńska, M., & Wróbel, J. (2020). The importance of biological and ecological properties of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud., In *Phytoremediation of Aquatic Ecosystems-The Review*. *Water*, 12(6), 1770.
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 431-450.
- Mohamed, Z. A. (2017). Macrophytes-cyanobacteria allelopathic interactions and their implications for water resources management-A review. *Limnologica*, 63, 122-132.
- Molisch, H. 1937. *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie*. Fischer, Jena.
- Moran, E.V. & Alexander, J.M. (2014) Evolutionary responses to global change: Lessons from invasive species. *Ecology Letters*, 17, 637-649.
- Morris, C., Grossl, P. R., & Call, C. A. (2009). Elemental allelopathy: Processes, progress, and pitfalls. *Plant Ecology*, 202(1), 1-11.
- Mowe, M. A., Song, Y., Sim, D. Z., Lu, J., Mitrovic, S. M., Tan, H. T., & Yeo, D. C. (2019). Comparative study of six emergent macrophyte species for controlling cyanobacterial blooms in a tropical reservoir. *Ecological Engineering*, 129, 11-21.
- Muhammad, Z., & Majeed, A. (2020). Allelopathy: Implications in natural and managed ecosystems. In *New Frontiers in Stress Management for Durable Agriculture*, 21-33. Springer, Singapore.
- Mulderij, G., Smolders, A. J., & Van Donk, E. L. L. E. N. (2006). Allelopathic effect of the aquatic macrophyte, *Stratiotes aloides*, on natural phytoplankton. *Freshwater Biology*, 51(3), 554-561.
- Mulderij, G., Van Nes, E. H., & Van Donk, E. (2007). Macrophyte-phytoplankton interactions: the relative importance of allelopathy versus other factors. *Ecological Modelling*, 204(1-2), 85-92.
- Müller, C. H. (1969). Allelopathy as a factor in ecological process. *Vegetatio*, 348-357.
- Müller, C. H. (1970). The role of allelopathy in the evolution of vegetation. In *Biochemical Co-evolution. Proceedings of the Twenty-ninth Annual Biology Colloquium*, 26-27.
- 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(8), 47-53.
- Nakai, S., Zhou, S., Hosomi, M., & Tominaga, M. (2006). Allelopathic growth inhibition of cyanobacteria by reed. *Allelopathy Journal*, 18(2), 277.
- Nakai, S., Zou, G., Okuda, T., Nishijima, W., Hosomi, M., & Okada, M. (2012). Polyphenols and fatty acids responsible for anti-cyanobacterial allelopathic effects of submerged macrophyte *Myriophyllum spicatum*. *Water Science and Technology*, 66(5), 993-999.
- Nakai, S., Zou, G., Okuda, T., Tsai, T. Y., Song, X., Nishijima, W., & Okada, M. (2010). Anti-cyanobacterial allelopathic effects of plants used for artificial floating islands. *Allelopathy Journal*, 26(1).
- Nakai, S., Zou, G., Song, X., Pan, Q., Zhou, S., & Hosomi, M. (2008). Release of anti-cyanobacterial allelochemicals from aquatic and terrestrial plants applicable for artificial floating islands. *Journal of Water and Environment Technology*, 6(1), 55-63.
- Nakamura, K., & Mueller, G. (2008). Review of the performance of the artificial floating island as a restoration tool for aquatic environments. In *World Environmental and Water Resources Congress 2008*, 1-10.

- Nandini, S., Sánchez-Zamora, C., & Sarma, S. S. S. (2019). Toxicity of cyanobacterial blooms from the reservoir Valle de Bravo (Mexico): A case study on the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Science of The Total Environment*, 688, 1348-1358.
- Nandini, S., Zamora-Barrios, C. A., & Sarma, S. S. S. (2020). A long-term study on the effect of cyanobacterial crude extracts from Lake Chapultepec (Mexico City) on selected zooplankton species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(12), 2409-2419.
- Neilan, B. A., Pearson, L. A., Muenchhoff, J., Moffitt, M. C., & Dittmann, E. (2013). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1239-1253.
- Nešić, M., Marković, M., Trajković, R., Pavlović, D., Ilić, M., Mitić, V., & Stankov-Jovanović, V. (2010). Total content of organic acids in plants from fire affected forest. *Biologica Nyssana*, 1, 65-69.
- Nimptsch, J., Wiegand, C., & Pflugmacher, S. (2008). Cyanobacterial toxin elimination via bioaccumulation of MC-LR in aquatic macrophytes: An application of the “Green liver concept”. *Environmental Science & Technology*, 42(22), 8552-8557.
- NIVA 1976. Estimation of algal growth potential. Norwegian Institute for Water Research, Publications. D2-25.
- Olguín, E. J., Sánchez-Galván, G., Melo, F. J., Hernández, V. J., & González-Portela, R. E. (2017). Long-term assessment at field scale of floating treatment wetlands for improvement of water quality and provision of ecosystem services in a eutrophic urban pond. *Science of the Total Environment*, 584, 561-571.
- Othman, R., Ramya, R., Hassan, N. M., & Kamoona, S. (2020). GCTOF-MS and HPLC identification of phenolic compounds with different fractional extracts of *Lepironia articulata*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 10(1), 1-6.
- Ouellette, A. J., & Wilhelm, S. W. (2003). Toxic cyanobacteria: the evolving molecular toolbox. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(7), 359-366.
- Paerl, H. W., & Huisman, J. (2009). Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1(1), 27-37.
- Park, J. B., Sukias, J. P., & Tanner, C. C. (2019). Floating treatment wetlands supplemented with aeration and biofilm attachment surfaces for efficient domestic wastewater treatment. *Ecological Engineering*, 139, 105582.
- Patrick, Z. A. (1971). Phytotoxic substances associated with the decomposition in soil of plant residues. *Soil Science*, 111(1), 13-18.
- Pavlineri, N., Skoulikidis, N. T., & Tsihrintzis, V. A. (2017). Constructed floating wetlands: A review of research, design, operation and management aspects, and data meta-analysis. *Chemical Engineering Journal*, 308, 1120-1132.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Beattie, K. A., Krause, E., Steinberg, C. E., & Codd, G. A. (2001). Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (cav.) Trin. Ex Steud. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(4), 846-852.
- Pham, T. L., & Utsumi, M. (2018). An overview of the accumulation of microcystins in aquatic ecosystems. *Journal of Environmental Management*, 213, 520-529.
- Pham, T. L., Tran, T. H. Y., Shimizu, K., Li, Q., & Utsumi, M. (2020). Toxic cyanobacteria and microcystin dynamics in a tropical reservoir: Assessing the influence of environmental variables. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-14.
- Pimentel, J. S., & Giani, A. (2014). Microcystin production and regulation under nutrient stress conditions in toxic *Microcystis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5836-5843.

- Plaxton, W. C. (2004). Plant response to stress: Biochemical adaptations to phosphate deficiency. *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. Marcel Dekker, New York, 976-980.
- Plaxton, W. C., & Tran, H. T. (2011). Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiology*, 156(3), 1006-1015.
- Polyak, Y. M., & Sukcharevich, V. I. (2019). Allelopathic interactions between plants and microorganisms in soil ecosystems. *Biology Bulletin Reviews*, 9(6), 562-574.
- Popovsky, J., & Pfiester, L. A. (1990). Dinophyceae (Dinoflagellida). In von A Pascher B, von Ettl H, Gerloff J, Heynig H, Mollenhauer D, Band 6: Süßwasserflora von Mitteleuropa.
- Prescott, G.W., (1962). *Algae of the western great lakes area*. Wm C Brown Co Dubuque, Iowa, 975.
- Proctor V.W., (1957). Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis*. *Ecology* 38:457-462
- Puche, E., Rojo, C., Ramos-Jiliberto, R., & Rodrigo, M. A. (2020). Structure and vulnerability of the multi-interaction network in macrophyte-dominated lakes. *Oikos*, 129(1), 35-48.
- Qi-ming, X., Hai-dong, C., Hui-xian, Z., & Da-qiang, Y. (2004). Analysis of organic acids in aqueous leachates of three submerged macrophytes. *Journal of Plant Resources and Environment*, 13(03), 57-58.
- Razal, R. A., Ellis, S., Singh, S., Lewis, N. G., & Towers, G. N. (1996). Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism. *Phytochemistry*, 41(1), 31-35.
- Reigosa, M. J., Sánchez-Moreiras, A., & González, L. (1999). Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(5), 577-608.
- Rejmánková, E. (2011). The role of macrophytes in wetland ecosystems. *Journal of Ecology and Environment*, 34(4), 333-345.
- Rejmánková, E. (2016). Phenolic content and growth of wetland macrophytes: Is the allocation to secondary compounds driven by nutrient availability? *Folia Geobotanica*, 51(3), 239-250.
- Ren, L., Guo, X., Liu, S., Yu, T., Guo, W., Wang, R. & Eller, F. (2020). Intraspecific variation in *Phragmites australis*: Clinal adaption of functional traits and phenotypic plasticity vary with latitude of origin. *Journal of Ecology*.
- Reynolds, C. S. (2006). *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Rice, E. L. (1984) *Allelopathy*. 2nd Ed. Academic Press, New York.
- Rizvi, S. J. H., & Rizvi, V. (1992). Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. In *Allelopathy*, 443-472. Springer, Dordrecht.
- Rolff, C., Almesjö, L., & Elmgren, R. (2007). Nitrogen fixation and abundance of the diazotrophic cyanobacterium *Aphanizomenon* sp. in the Baltic Proper. *Marine Ecology Progress Series*, 332, 107-118.
- Romero-Oliva, C. S., Contardo-Jara, V., & Pflugmacher, S. (2015). Time dependent uptake, bioaccumulation and biotransformation of cell free crude extract microcystins from Lake Amatitlán, Guatemala by *Ceratophyllum demersum*, *Egeria densa* and *Hydrilla verticillata*. *Toxicon*, 105, 62-73.
- Rooney, R. C., & Yuckin, S. (2019). Significant increase in nutrient stocks following *Phragmites australis* invasion of freshwater meadow marsh but not of cattail marsh. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 112.
- Round, F. E., Crawford, R. M., & Mann, D. G. (1990). *Diatoms: Biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press.

- Rudrappa, T., Choi, Y. S., Levia, D. F., Legates, D. R., Lee, K. H., & Bais, H. P. (2009). *Phragmites australis* root secreted phytotoxin undergoes photo-degradation to execute severe phytotoxicity. *Plant Signaling & Behavior*, 4(6), 506-513.
- Sabour, B., Loudiki, M., & Vasconcelos, V. (2009). Growth responses of *Microcystis ichthyoblabe* Kützing and *Anabaena aphanizomenoides* Forti (cyanobacteria) under different nitrogen and phosphorus conditions. *Chemistry and Ecology*, 25(5), 337-344.
- Salminen, J. P., & Karonen, M. (2011). Chemical ecology of tannins and other phenolics: We need a change in approach. *Functional Ecology*, 25(2), 325-338.
- Salomon, E., Bar-Eyal, L., Sharon, S., & Keren, N. (2013). Balancing photosynthetic electron flow is critical for cyanobacterial acclimation to nitrogen limitation. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics*, 1827(3), 340-347.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999.
- Santonja, M., Le Rouzic, B., & Thiébaud, G. (2018). Seasonal dependence and functional implications of macrophyte-phytoplankton allelopathic interactions. *Freshwater Biology*, 63(9), 1161-1172.
- Šantrůčková, H., Rejmánková, E., Pivničková, B., & Snyder, J. M. (2010). Nutrient enrichment in tropical wetlands: shifts from autotrophic to heterotrophic nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, 101(1), 295-310.
- Scavo, A., Restuccia, A., & Mauromicale, G. (2018). Allelopathy: Principles and basic aspects for agroecosystem control. In *Sustainable Agriculture Reviews* 28, 47-101. Springer, Cham.
- Schandry, N., & Becker, C. (2020). Allelopathic plants: models for studying plant–interkingdom interactions. *Trends in Plant Science*, 25(2), 176-185.
- Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K. & Stitt, M. (2004). Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiology*, 136(1), 2483-2499.
- Schindler, D. W., Carpenter, S. R., Chapra, S. C., Hecky, R. E., & Orihel, D. M. (2016). Reducing phosphorus to curb lake eutrophication is a success. *Environmental Science & Technology*, 50(17), 8923-8929.
- Sedmak, B., & Kosi, G. (1998). The role of microcystins in heavy cyanobacterial bloom formation. *Journal of Plankton Research*, 20(4), 691-708.
- Shanab, S. M., Shalaby, E. A., Lightfoot, D. A., & El-Shemy, H. A. (2010). Allelopathic effects of water hyacinth [*Eichhornia crassipes*]. *PloS One*, 5(10), e13200.
- Shao, J., Li, R., Lepo, J. E., & Gu, J. D. (2013). Potential for control of harmful cyanobacterial blooms using biologically derived substances: Problems and prospects. *Journal of Environmental Management*, 125, 149-155.
- Skulberg, O. M., Carmichael, W. W., Codd, G. A., & Skulberg, R. (1993). Taxonomy of toxic Cyanophyceae (cyanobacteria). *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*, 145-164.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Smith, G. D., & Doan, N. T. (1999). Cyanobacterial metabolites with bioactivity against photosynthesis in cyanobacteria, algae and higher plants. *Journal of Applied Phycology*, 11(4), 337-344.

- Smolders, A. J. P., Vergeer, L. H. T., Van der Velde, G., & Roelofs, J. G. M. (2000). Phenolic contents of submerged, emergent and floating leaves of aquatic and semi-aquatic macrophyte species: why do they differ? *Oikos*, 91(2), 307-310.
- Song, B., Xiong, J., Fang, C., Qiu, L., Lin, R., Liang, Y., & Lin, W. (2008). Allelopathic enhancement and differential gene expression in rice under low nitrogen treatment. *Journal of Chemical Ecology*, 34(5), 688-695.
- Srivastava, J., Kalra, S. J., & Naraian, R. (2014). Environmental perspectives of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex. Steudel. *Applied Water Science*, 4(3), 193-202.
- Staub R (1961) Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. *Schweiz Z Hydrol* 23(1), 82-198.
- Stevenson, R. J., Bothwell, M. L., Lowe, R. L., & Thorp, J. H. (1996). *Algal ecology: Freshwater Benthic Ecosystem*. Academic press.
- Stintzing, F., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 15:19-38.
- Sukenik, A., Quesada, A. & Salmaso, N. (2015) Global expansion of toxic and non-toxic cyanobacteria: effect on ecosystem functioning. *Biodiversity and Conservation*, 24, 889-908.
- Sun, J., & Liu, D. (2003). Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 25(11), 1331-1346.
- Švanys, A., Paškauskas, R., & Hilt, S. (2014). Effects of the allelopathically active macrophyte *Myriophyllum spicatum* on a natural phytoplankton community: A mesocosm study. *Hydrobiologia*, 737(1), 57-66.
- Tan, K., Huang, Z., Ji, R., Qiu, Y., Wang, Z., & Liu, J. (2019). A review of allelopathy on microalgae. *Microbiology*, 165(6), 587-592.
- Tazart, Z., Douma, M., Tebaa, L., & Loudiki, M. (2019). Use of macrophytes allelopathy in the biocontrol of harmful *Microcystis aeruginosa* blooms. *Water Supply*, 19(1), 245-253.
- Tell, G. & V. Conforti, (1986). *Euglenophyta pigmentadas de la Argentina*. *Bibliotheca Phycologica* 75, Berlin-Stuttgart. 301 pp
- Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 297-304.
- Triantis, T., Tsimeli, K., Kaloudis, T., Thanassoulis, N., Lytras, E., & Hiskia, A. (2010). Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters. *Toxicon*, 55(5), 979-989.
- Triest, L., Stiers, I., & Van Onsem, S. (2016). Biomanipulation as a nature-based solution to reduce cyanobacterial blooms. *Aquatic Ecology*, 50(3), 461-483.
- Uddin, M. N., & Robinson, R. W. (2017). Responses of plant species diversity and soil physical-chemical-microbial properties to *Phragmites australis* invasion along a density gradient. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- Uddin, M. N., & Robinson, R. W. (2018). Can nutrient enrichment influence the invasion of *Phragmites australis*? *Science of the Total Environment*, 613, 1449-1459.
- Uddin, M. N., Caridi, D., & Robinson, R. W. (2012). Phytotoxic evaluation of *Phragmites australis*: An investigation of aqueous extracts of different organs. *Marine and Freshwater Research*, 63(9), 777-787.
- Uddin, M. N., Robinson, R. W., Caridi, D., & Harun, M. A. (2014). Is phytotoxicity of *Phragmites australis* residue influenced by decomposition condition, time and density? *Marine and Freshwater Research*, 65(6), 505-516.

- Urakawa, H., Dettmar, D. L., & Thomas, S. (2017). The uniqueness and biogeochemical cycling of plant root microbial communities in a floating treatment wetland. *Ecological Engineering*, 108, 573-580.
- Utkilen, H., & Gjørlme, N. I. N. A. (1995). Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 797-800.
- Valeriano-Riveros, M. E., Vilaclara, G., Castillo-Sandoval, F. S., & Merino-Ibarra, M. (2014). Phytoplankton composition changes during water level fluctuations in a high-altitude, tropical reservoir. *Inland Waters*, 4(3), 337-348.
- Van Aller, R. T., Pessoney, G. F., Rogers, V. A., Watkins, E. J., & Leggett, H. G. (1985). Oxygenated fatty acids: A class of allelochemicals from aquatic plants. *ACS Symposium Series*, 268, 387-400.
- Van Apeldoorn, M. E., Van Egmond, H. P., Speijers, G. J., & Bakker, G. J. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1), 7-60.
- Van der Grinten, E., Janssen, A. P., de Mutsert, K., Barranguet, C., & Admiraal, W. (2005). Temperature- and light-dependent performance of the cyanobacterium *Leptolyngbya foveolarum* and the diatom *Nitzschia perminuta* in mixed biofilms. *Hydrobiologia*, 548(1), 267-278.
- Wang, H. Q., Cheng, S. P., Zhang, S. H., He, F., Liang, W., Zhang, L. P., & Wu, Z. B. (2010). Chemical composition in aqueous extracts of *Potamogeton malaianus* and *Potamogeton maackianus* and their allelopathic effects on *Microcystis aeruginosa*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(1).
- Wang, H., Liang, F., & Zhang, L. (2015). Composition and anti-cyanobacterial activity of essential oils from six different submerged macrophytes. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24(1).
- Wang, J., Zhu, J., Liu, S., Liu, B., Gao, Y., & Wu, Z. (2011). Generation of reactive oxygen species in cyanobacteria and green algae induced by allelochemicals of submerged macrophytes. *Chemosphere*, 85(6), 977-982.
- Wang, Y., Sun, B., Gao, X., & Li, N. (2019). Development and evaluation of a process-based model to assess nutrient removal in floating treatment wetlands. *Science of the Total Environment*, 694, 133633.
- Wardle, D. A., Karban, R., & Callaway, R. M. (2011). The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(12), 655-662.
- Weidenhamer, J. D. (2008). Allelopathic mechanisms and experimental methodology. In *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*, 119-135. Springer, New York, NY.
- West, M., Fenner, N., Gough, R., & Freeman, C. (2017). Evaluation of algal bloom mitigation and nutrient removal in floating constructed wetlands with different macrophyte species. *Ecological Engineering*, 108, 581-588.
- Weston, L. A. (1996). Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. *Agronomy Journal*, 88(6), 860-866.
- Weston, L. A., Ryan, P. R., & Watt, M. (2012). Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3445-3454.
- Wetzel, R. G., & Likens, G. E. (2013). *Limnological analyses*. Springer Science & Business Media.
- Whitton, B. A., & Potts, M. (2012). Introduction to the cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria 2*, 1-13. Springer Netherlands.

- Wiegand, C., & Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3), 201-218.
- Williamson, G. B., & Weidenhamer, J. D. (1990). Bacterial degradation of juglone. *Journal of Chemical Ecology*, 16(5), 1739-1742.
- Wium-Andersen, S. 1987. Allelopathy among aquatic plants, *Archiv fuer Hydrobiologie Beitrage*, 27: 167-172.
- Wolfe, G. V. (2000). The chemical defense ecology of marine unicellular plankton: Constraints, mechanisms, and impacts. *The Biological Bulletin*, 198(2), 225-244.
- World Health Organization. (1998). Guidelines for drinking-water quality. Vol. 2, Health criteria and other supporting information: addendum (No. WHO/EOS/98.1). World Health Organization.
- Wu, X., Wu, H., Chen, J., & Ye, J. (2013). Effects of allelochemical extracted from water lettuce (*Pistia stratiotes* Linn.) on the growth, microcystin production and release of *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(11), 8192-8201.
- Wynne, T. T., & Stumpf, R. P. (2015). Spatial and temporal patterns in the seasonal distribution of toxic cyanobacteria in Western Lake Erie from 2002–2014. *Toxins*, 7(5), 1649-1663.
- Xiao, T., Yu, H., Song, Y. B., Jiang, Y. P., Zeng, B., & Dong, M. (2019). Nutrient enhancement of allelopathic effects of exotic invasive on native plant species. *Plos One*, 14(1), e0206165.
- Yéprémian, C., Catherine, A., Bernard, C., Congestri, R., Elerseck, T., & Pilkaityte, R. (2016). Phycocyanin extraction and determination. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, 335-338.
- Zhang, H., Zhao, Y., Yin, H., Wang, Y., Li, H., Wang, Z., & Wang, H. (2019). Effect of aquatic macrophyte growth on landscape water quality improvement. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(33), 33791-33803.
- Zhang, S. H., Chang, J. J., Cao, J. Y., & Yang, C. L. (2015a). Comparative studies on growth and physiological responses of unicellular and colonial *Microcystis aeruginosa* to *Acorus calamus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(2), 225-231.
- Zhang, S. H., Guo, L., Cao, J. Y., & Chang, J. J., (2015b). Allelopathic activities of three emergent macrophytes on several monospecific cyanobacterial species and natural phytoplankton assemblages. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24(1).
- Zhang, T. T., Hu, W., & Zhang, D. (2012). Allelopathic effect of *Typha angustifolia* L. on phytoplankton. In *Advanced Materials Research*, 383, 3724-3728. Trans Tech Publications Ltd.
- Zhou, S., Nakai, S., Hosomi, M., Sezaki, & Tominaga, M., (2006). Allelopathic growth inhibition of cyanobacteria by reed. *Allelopathy Journal*, 18(2), 277.
- Zhu, M., Zhu, G., Zhao, L., Yao, X., Zhang, Y., Gao, G., & Qin, B. (2013). Influence of algal bloom degradation on nutrient release at the sediment-water interface in Lake Taihu, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(3), 1803-1811.
- Zhu, X., Dao, G., Tao, Y., Zhan, X., & Hu, H. (2020). A review on control of harmful algal blooms by plant-derived allelochemicals. *Journal of Hazardous Materials*, 123403.
- Zimmerman, C. L., Shirer, R. R., & Corbin, J. D. (2018). Native plant recovery following three years of common reed (*Phragmites australis*) control. *Invasive Plant Science and Management*, 11(4), 175-180.

ANEXO 1

Artículo de requisito

Chicalote-Castillo, D., Ramirez-Garcia, P., & Macías-Rubalcava, M. L. (2017). Allelopathic effects among selected species of phytoplankton and macrophytes. *Journal of Environmental Biology*, 38(6), 1221-1227.



DOI: [http://doi.org/10.22438/jeb/38/6\(SI\)/07](http://doi.org/10.22438/jeb/38/6(SI)/07)

Allelopathic effects among selected species of phytoplankton and macrophytes

Journal Home page: www.jeb.co.in ★ E-mail: editor@jeb.co.in

Journal of Environmental Biology

JEB™

ISSN: 0254-8704 (Print)
ISSN: 2394-0379 (Online)
CODEN: JEBIDP



Authors Info

D. Chicalote-Castillo,
P. Ramirez-García* and
M.L. Macías-Rubalcava²

¹Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Iztacala, Research and Postgraduate Division, Av. de los Barrios No. 1, 54090 Tlalnepantla, Estado de México, México

²Universidad Nacional Autónoma de México. Institute of Chemistry Department of Natural Products Ciudad Universitaria, Mexico City, Del.Coyoacán 04510, Mexico

*Corresponding Author Email : micro@unam.mx

Key words

Allelopathy
Microcystis aeruginosa
Phragmites australis
Scenedesmus acutus
Schoenoplectus californicus

Publication Info

Paper received : 13.09.2016
Revised received : 03.01.2017
Re-revised received : 24.05.2017
Accepted : 11.08.2017

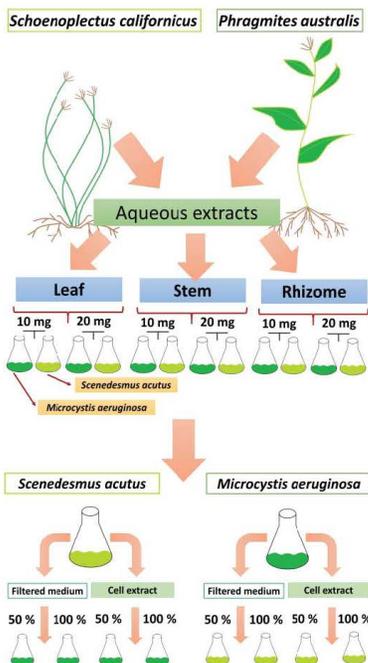
Abstract

Aim: To understand the allelopathy among different taxonomic levels of freshwater photoautotrophs, the effect of aqueous extracts of *Phragmites australis* and *Schoenoplectus californicus* on monocultures of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus acutus* was investigated. In addition, the cell extract and filtered medium of each phytoplankton species were used and tested between them.

Methodology: In the macrophyte bioassays against alga, the allelopathic effect was evaluated separately using 10 and 20 mg of aqueous extract of leaf, stem and rhizome of *Phragmites*, as well as the stem and rhizome of *Schoenoplectus*. In the assays between the phytoplankton species, the cell extract ($12.44 \pm 0.16 \mu\text{g l}^{-1}$ microcistin-LR equivalents) and the filtered culture medium ($2.98 \pm 0.03 \mu\text{g l}^{-1}$ microcistin-LR equivalents) of *Microcystis* were used in 100 and 50% and were added to the *Scenedesmus* monocultures. In the same proportion, the cell extract and the filtered culture medium of *Scenedesmus* on monocultures of *Microcystis* were used.

Results: In *Phragmites*, leaf extract showed greater inhibition activity than the other plant organs on *Microcystis* cultures. The stem and rhizome showed a larger decrease for the growth of *Scenedesmus* cultures. For *Schoenoplectus*, the stem extract showed a greater inhibitory effect than the rhizome extract; this was observed on both alga and cyanobacteria. *Microcystis* when in contact with the cellular extract of *Scenedesmus*, it was observed that the bioactive containing substances in the extract had a greater inhibitory activity.

Interpretation: The leaf, stem and rhizome extracts of *Phragmites* and *Schoenoplectus* showed a different affinity of the allelopathic activity on *Microcystis* and *Scenedesmus*, suggesting a species-specific relationship.



Introduction

Allelopathy prevents competitors from making use of available resources, affecting growth and distribution of other species and therefore can control the environment in which they live (Thorpe et al., 2011). In aquatic systems, macrophytes released infochemicals through of root, stem or leaf (Gross et al., 2007; Uddin et al., 2012). Species of phytoplankton release their bioactive compounds directly into water or are retained in the sediment (Bhadoria, 2011). The allelopathic effects of substances from macrophytes on the harmful algal blooms are gaining importance recently (Hong-Qiang et al., 2014). However, it is expected that active compounds released from macrophytes reach the recipient species and somehow affect their metabolism (Gao et al., 2011; Gross et al., 2012). From the macrophyte *Phragmites*, the most frequent allelochemicals are phenols, in particular gallic acid and to a lesser extent the organic acid ethyl 2-methylacetoacetate, which are obtained from exudates and roots. The leaf contains allelochemicals such as taraxerol and taraxeron. The allelopathic effect of these compounds have been evaluated on cultures of *Chlorella pyrenoidosa* and *Microcystis aeruginosa* (Li and Hu, 2005; Rudrappa et al., 2007). Phenolic compounds are also produced by *Schoenoplectus*, which have been isolated from the whole plant. The phenol (-) catechin showed a similar algacide effect to that of CuSO₄ to *Selenastrum capricornutum* (D'Abrósca et al., 2006). However, its effect on cyanobacteria such as *Microcystis aeruginosa* has not been tested.

Cyanobacterial blooms generally produce secondary metabolites such as cyanotoxins, which can be released directly into the environment by senescence or cell lysis (Dittmann et al., 2013; Neilan et al., 2013). Cyanotoxins may cause damage directly (lethal) or indirectly (chronic) to different aquatic organisms due to accumulation effect. Their main function is the growth inhibition in other organisms, reducing the number of species that are potential competitors or grazers (Lin et al., 2014; Rao et al., 2015). In *Microcystis aeruginosa* the mechanism of action of its toxins affects several Chlorophytes such as *Chlamydomonas neglecta*, *C. reinhardtii*, *Chlorella ellipsoidea*, *C. pyrenoidosa*, *C. vulgaris* and *Monoraphidium convolutum* (Ishida and Murakami, 2000; Yang et al., 2014; Bittencourt-Oliveira et al., 2015).

Few studies have assessed the effect of dissolved microcystins and cyanobacterial biomass containing toxins at concentrations similar those found in nature (1-10 µg l⁻¹ microcystin-LR) to phytoplankton species (Kearns and Hunter, 2001; Bittencourt-Oliveira et al., 2013). Many photoautotrophs are capable of producing bioactive substances (Erhard, 2006). For example, chemicals released by *Scenedesmus* are capable of inhibiting the growth of *M. aeruginosa* (Jia et al., 2008; Chen and Guo, 2014). Species interaction experiments usually are done to provoke the release of allelochemicals in the producer

species (Bittencourt-Oliveira et al., 2015). However, bioactive substances are permanently present in algae and since they are fundamental part of the physiological processes, they are involved in the growth and development. These in turn may function as interacting substances with the environment in adaptation and defense, as is the case with cyanotoxins (Leflaive and Ten-Hage, 2007). Therefore, it is necessary to know the allelopathic effects of common photoautotrophic organisms in aquatic systems for understanding the role of allelopathic processes in nature.

The aim of the present work was to evaluate the allelopathic effect of aqueous extracts of *P. australis* and *S. californicus* to *M. aeruginosa* and *S. acutus* and to quantify the effect of conditioned medium from *M. aeruginosa* on *S. acutus* and vice versa.

Materials and Methods

Culture conditions : *M. aeruginosa* was isolated from Valle de Bravo reservoir, State of Mexico (Mexico) while *S. acutus* (Meyen) (strain no. 72) was obtained from the University of Texas, (Austin, Texas). Both the species were cultured on Z8 liquid medium (Staub, 1961; NIVA, 1972). The cultures were homogenized using an orbital shaker at 90 rpm (Labnet, Orbit 1900) at 26±2°C, pH 6.8 and a photosynthetic active radiation (PAR) of 90 µmol photons m⁻² s⁻¹, using cold white fluorescent light with a photoperiod of 14:10 h (light/dark). PAR was measured through a quantum sensor equipped with a semi-spherical sensor (Apogee Instruments, MQ-200). The emergent macrophytes, *P. australis* and *S. californicus* were collected from the La mintzita reservoir (State of Michoacán, Mexico). Whole plants were selected. Six plants of *Phragmites* and *Schoenoplectus* were taken with an average length of 1.61 ± 0.04 and 1.63 ± 0.09 m, respectively.

Aqueous extracts, cell extracts and filtered culture medium : The macrophytes were dried at 26±2°C for five days. Each of the three structures (leaf, stem and rhizome) plant were weighed (20 g), which were separately macerated with 50 ml water chromatographic grade (Sigma-Aldrich 34877) for 24 hr. Subsequently the first extracts were filtered by filter paper (Whatman qualitative, Grade 1) and lyophilized (Labcono, LYPH LOCK 4.5). The extract was filtered by Millipore system with 0.45 µm nitrocellulose membrane (Merck, MF-Millipore HAWP04700), that was used in the assays.

Algal aqueous extracts were separately obtained from the cultures in 350 ml of Z8 medium, whose cell density was 2.90 ± 0.46 × 10⁸ cell ml⁻¹ for *M. aeruginosa* and 2.90 ± 0.46 × 10⁸ cell ml⁻¹ for *S. acutus*. The cells were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min (BOECO, SC-8). The sediment was lyophilized and 0.5 g dry weight of algal biomass was used and suspended in 150 ml of fresh Z8 medium. The extract was filtered with 0.45 µm membrane. The supernatant was filtered through the Millipore

system with the same membrane pore size for the aqueous extract.

Quantification of microcystin concentration: The microcystins, both dissolved and intracellular form were analyzed with a Quanti Plate™ Kit for Microcystin (Envirologix). The analyses were done in triplicates and the results were expressed as $\mu\text{g l}^{-1}$ microcystin-LR equivalents.

Allelopathy bioassays: For the macrophyte bioassays against phytoplankton (alga and cyanobacterium), we used 10 and 20 mg of aqueous extract from leaf, stem and rhizome of *Phragmites*, and the stem and rhizome of *Schoenoplectus*. For the algal bioassay, the cell extract ($12.44 \pm 0.16 \mu\text{g l}^{-1}$ microcystin-LR equivalents) and the filtered culture medium ($2.98 \pm 0.03 \mu\text{g l}^{-1}$ microcystin-LR equivalents) of *Microcystis* (as 100 and 50%) were added to the *Scenedesmus* cultures. In the same proportion, the cell extract and the filtered medium of *Scenedesmus* were added to the cultures of *Microcystis*. Both the phytoplankton species were cultured in triplicate in 25 ml volume of Z8 medium. The cell densities of *Scenedesmus* and *Microcystis* were separately estimated using a hemocytometer at initial, day 2 and day 4 after

fixing the samples in 20% Lugol. When cell counting was performed to determine the effect of the extracts and to compare it with the cell number of the control cultures, it was observed that the decrease of the organisms below the cell inoculum at day zero was due to the fragmentation and agglomeration of the cells, so that the cell portions were not considered in the cell count for the results.

Two-way repeated measures ANOVA was applied with a post hoc means analysis using a Bonferroni's multiple comparisons test with an alpha of 0.05 level of significance to compare growth differences among treatments.

Results and Discussion

The 10 mg aqueous extract of *Phragmites* on *Microcystis* cultures showed that the leaf had an inhibiting effect. This decrease was maintained during the 4 days of the trial. A significant difference ($p < 0.01$) was observed in the cell density in cultures with the extract vs *Microcystis* controls. The stem and rhizome extracts showed no significant effects ($p > 0.05$). *Scenedesmus* was sensitive to the extracts from *Phragmites*. The

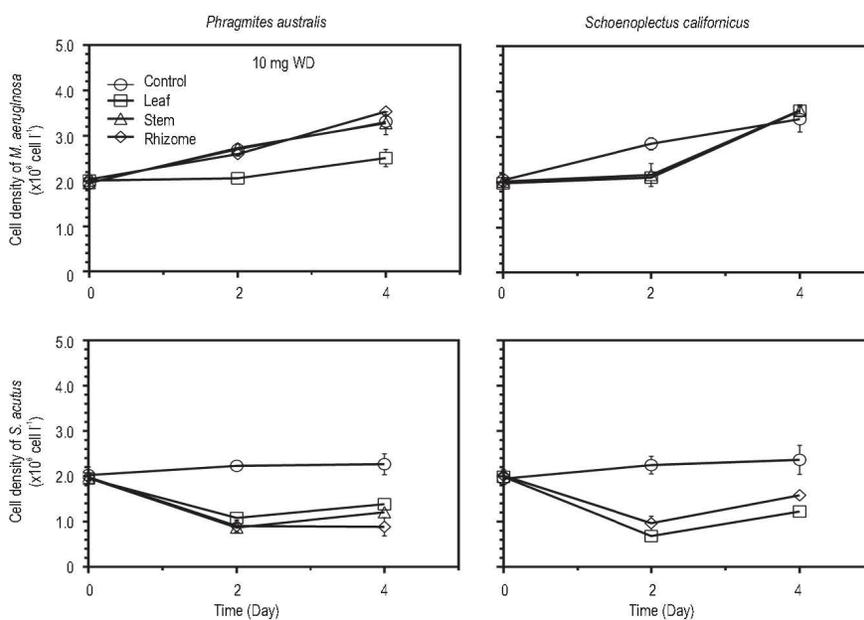


Fig. 1 : The effect of 10 mg concentration in dry weight of the aqueous extracts of each macrophytes structural parts *P. australis* and *S. californicus* to *M. aeruginosa* and *S. acutus* are shown. Error bars are based in three replicates

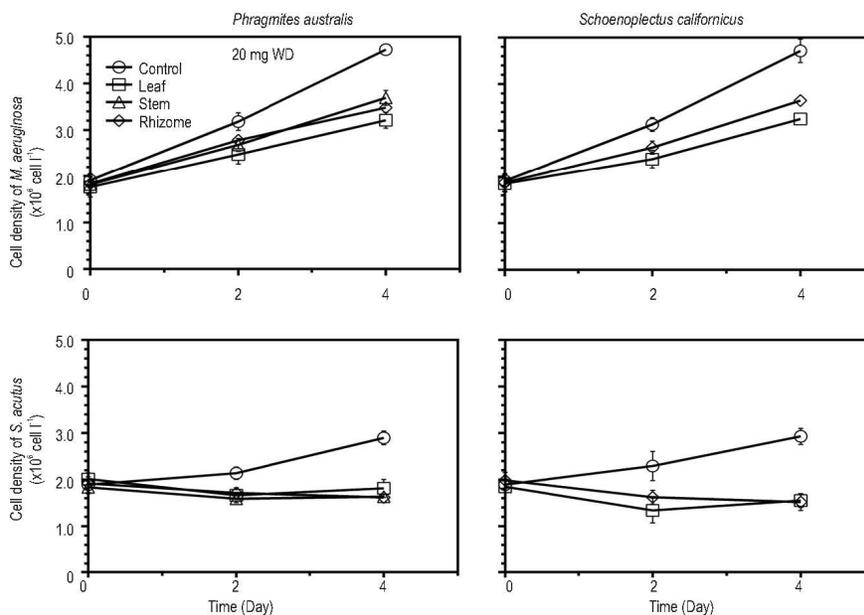


Fig. 2 : A concentration of 20 mg of each extract of *P. australis* and *S. californicus* was used to evaluate the allelopathic effect against the phytoplankton species *M. aeruginosa* and *S. acutus*. Error bars are based in three replicates

significant ($p < 0.01$) inhibitory effects were observed during the four days of the experiment. The stem and rhizome extracts of *Schoenoplectus* decreased the growth of *Microcystis*. A significant difference ($p < 0.01$) was observed only on day 2 as compared to control. At day 4, both extracts lost their inhibition effect, so that *Microcystis* was able to reach densities similar to control. In *Scenedesmus* it was observed that the low growth was maintained to a greater degree by the stem extract during the experiment. The negative effect of both extracts were significantly different ($p < 0.01$) from controls and by day 4 the effect of the extracts was lower (Fig. 1).

At 20 mg concentration, the leaf extract showed a greater negative effect on the growth of *Microcystis*, followed by stem and rhizome, the lower effects being on day 2. The three extracts had a negative effect on *Microcystis* and there were significances among them ($p < 0.01$) to the cell growth in the control cultures. The growth of *Scenedesmus* differed significantly ($p < 0.01$) from controls with the three extracts of 20 mg of *Phragmites*. The extracts of *Schoenoplectus* also showed a tendency of inhibition on both *Microcystis* and *Scenedesmus*. However, it was observed that *Microcystis* is able to increase its cell number

despite exposure to extracts unlike *Scenedesmus* where the inhibition effect was maintained during the assay (Fig. 2).

The recurrent tendency of decreasing effects of the extracts from both macrophytes is due to bioactive substances, mainly phenols. These compounds are prone to oxidation, so their persistence once extracted from the plant tissues is about 4 days and hence experiments longer than this duration do not reflect the bioactivity of the compound (Sampietro et al., 2009; Li et al., 2012). Our results are consistent with the inhibitory effect of *Phragmites* and *Schoenoplectus* on different species reported in literature (D'Abrósca et al., 2006; Addisie and Medellín, 2012; Chang et al., 2012). *Phragmites* leaf extract showed greater inhibition activity than the other plant organs on *Microcystis* cultures. The stem and rhizome showed a stronger decrease on *Scenedesmus*. For *Schoenoplectus*, the stem extract showed a greater inhibitory effect than the rhizome for both phytoplankton species tested.

The differences in allelopathic effects produced by aqueous extracts are partly due to the site where the bioactive substances are produced in the macrophytes. *Phragmites* has well developed leaf blades, where the synthesis of most of the

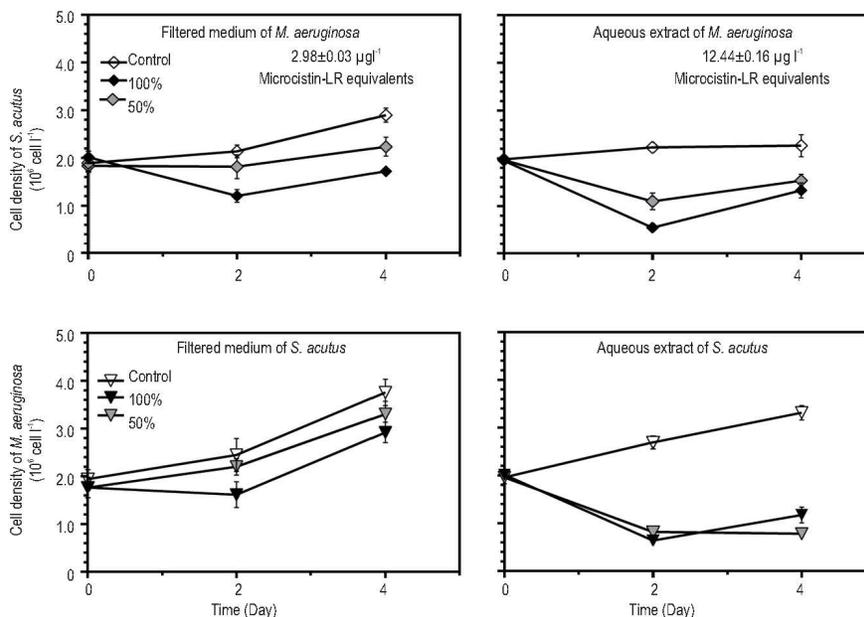


Fig. 3: Allelopathic effect of the filtered medium and cell extract *M. aeruginosa* in a proportion of 100 and 50% to the cultures of *S. acutus* and vice versa. Are shown in each treatment the microcystin-LR equivalents ($\mu\text{g l}^{-1}$) quantified in *Microcystis* cultures. Error bars are based in three replicates

secondary metabolites occurs. *Schoenoplectus*, on the other hand, lacks leaf blades, so the site of greatest production of secondary metabolites is the stem (Weston *et al.*, 2012).

In this work we observed that the leaf, stem and rhizome extracts of *Phragmites* and *Schoenoplectus* showed different affinities for allelopathic activity on *Microcystis* and *Scenedesmus*, suggesting a species-specific relationship. Variability in sensitivity to bioactive substances has been reported even within species of the same genus. For example *Chlorella pyrenoidosa* is susceptible to *Phragmites* compounds but *Chlorella vulgaris* is not (Li and Hu, 2005). The degree of interaction that a bioactive substance has is related to the particular characteristics of recipient species (Nakai *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2011; Sheng-hua *et al.*, 2015). In addition, some recipient species may also develop resistance, while others do not. For example, only some recipient species in a given ecosystem exhibit a weak or no sensitivity to allelochemicals (Švanyš *et al.*, 2014).

Allelopathic activity in this work is also based on macrophyte exudates which are the allelochemicals released

directly into the medium. Under conditions of water depletion the macrophytes activate various signaling mechanisms for the synthesis of new bioactive substances or retain the compounds already produced in a particular tissue (Choi *et al.* 2009). This condition may occur in this work and therefore the same kind of allelochemicals were consistently present in our test jars. Further we recorded that the inhibition activity of extracts from *Phragmites* and *Schoenoplectus* was most noticeable at four days of bioassay. This can be explained by exposure of the bioactive substances to other chemical forms dissolved in water, which hinder the inhibiting effect on sensitive recipient species. The dilution affects the intensity of allelopathic effects and the allelochemicals should have hydrophilic properties to reach the receptor cells (Macias *et al.*, 2008; Gross *et al.*, 2012). Therefore, the concentration at 20 mg in the extracts of both macrophytes was able to cause negative effects on the growth of *Microcystis* and *Scenedesmus* as compared to 10 mg concentration.

In the bioassays where the allelopathic effect of dissolved microcystin ($2.98 \pm 0.03 \mu\text{g l}^{-1}$) was evaluated on *Scenedesmus* cultures, no significant differences ($p > 0.05$) were observed when

50% of the filtered medium was used, with respect to controls. Only on the fourth day the density of *Scenedesmus* decreased. The allelopathic effect was constant during the experiment period when 100% of the filtered medium was used, resulting significantly different ($p < 0.01$) from control (Fig. 3). The filtered medium was still effective in inhibiting *Scenedesmus* despite the low levels of microcystin. These results contrast with other studies where microcystin at 1-10 $\mu\text{g l}^{-1}$ did not cause a negative effect on *S. quadricauda* and *S. obliquus*; the allelopathic effect was observed at microcystin concentration of 50 to 25000 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Babica et al., 2007; El Sheekh et al., 2010).

The allelopathic effect in our study could be compounded by the presence of other substances in the filtered medium of *Microcystis* (Bittencourt-Oliveira et al., 2013). The cell extract of 100% *Microcystis* ($12.44 \pm 0.16 \mu\text{g l}^{-1}$) had a stronger inhibitory effect than the proportion of 50% on the growth of *Scenedesmus* at day 2 of the assay. However, for day 4, the 100% extract reduced its effect until reaching the proportion of 50% (Fig. 3), suggesting that the decrease on *Scenedesmus* was due to a chronic effect by the accumulation of microcystins. Bittencourt-Oliveira et al. (2015) mentioned that *S. acuminatus* cultures did not suffer from allelopathic effects when exposed to crude extracts of *M. aeruginosa* at 5-10 $\mu\text{g l}^{-1}$ of microcystin-LR. The allelochemicals released by *Scenedesmus* negatively affect cyanobacteria (Jia et al., 2008; Chen and Guo, 2014), as also observed here. The inhibitory effect was more pronounced when using the cell extract. This implies that the susceptibility of cyanobacteria to the bioactive substances of *Scenedesmus* is high, since the low proportion was sufficient enough to cause an adverse effect similar to the 100% of the extract. These results indicate the interactions between algae and *Microcystis* in nature are probably more diverse than those derived from laboratory tests.

Acknowledgments

This work is a part of the academic compliance with the Graduate Program in Biological Sciences at the National Autonomous University of Mexico (UNAM). The document was made with the financial support of the National Program of Scholarships for Graduate Studies of National Council of Science and Technology (CONACYT).

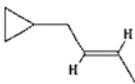
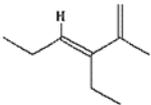
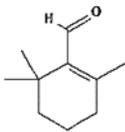
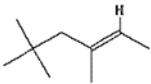
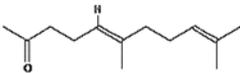
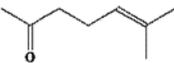
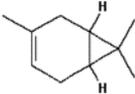
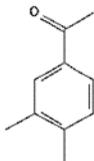
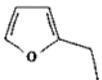
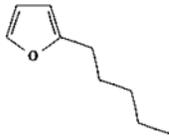
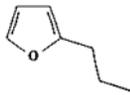
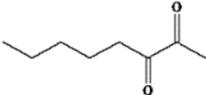
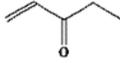
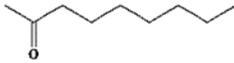
References

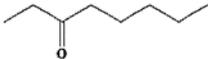
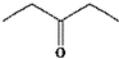
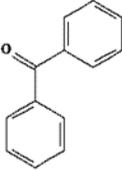
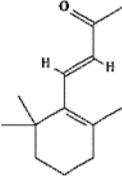
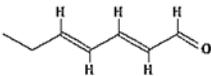
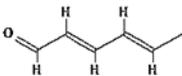
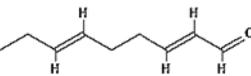
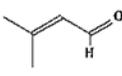
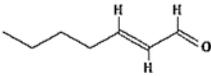
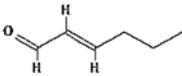
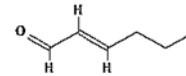
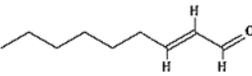
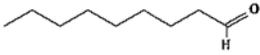
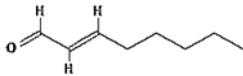
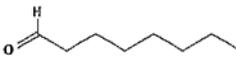
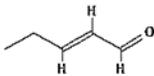
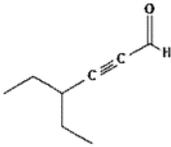
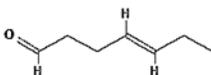
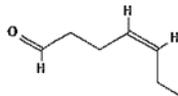
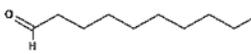
- Addisie, Y. and C. Medellín: Allelopathy in aquatic macrophytes: Effects on growth and physiology of phytoplankton. *Afr. J. Plant Sci.*, **6**, 270-276 (2012).
- Babica, P., L. Bláha and B. Maršálek: Exploring the natural role of microcystins. A review of effects on photoautotrophic organisms. *J. Phycol.*, **42**, 9-20 (2006).
- Bhadoria, P.B.S.: Allelopathy: A natural way towards weed management. *Am. J. Exp. Agric.*, **1**, 7-20 (2011).
- Bittencourt-Oliveira, Md., D. Camargo-Santos, A. dN.Moura, I.B. Francisco, C.T. Dias, R.J. Molica and M.K. Cordeiro-Araújo: Effects of toxic and non-toxic crude extracts on different *Microcystis* species (Cyanobacteria). *Afr. J. Microbiol. Res.*, **7**, 2596-2600 (2013).
- Bittencourt-Oliveira, Md., M. Chia, H. de Oliveira, M. Cordeiro-Araújo, R. Molica and C. Dias: Allelopathic interactions between microcystin-producing and non-microcystin-producing cyanobacteria and green microalgae: implications for microcystins production. *J. Appl. Phycol.*, **27**, 275-284 (2015).
- Chang, X., F. Eigemann and S. Hill: Do macrophytes support harmful cyanobacteria? Interactions with a green alga reverse the inhibiting effects of macrophyte allelochemicals on *Microcystis aeruginosa*. *Harmful Algae*, **19**, 76-84 (2012).
- Chen, J.Q. and R.X. Guo: Inhibition effect of green alga on cyanobacteria by the interspecies interactions. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, **11**, 839-842 (2014).
- Choi, S.E., J.H. Yoon, H.K. Choi and M.W. Lee: Phenolic compounds from the root of *Phragmites communis*. *Chem. Nat. Compd.*, **45**, 893-895 (2009).
- D'Abrosca, B., M. Dellagrecia, A. Fiorentino, M. Isidori, P. Monaco and S. Pacifico: Chemical constituents of the aquatic plant *Schoenoplectus lacustris*: Evaluation of phytotoxic effects on the green alga *Selenastrum capricornutum*. *J. Chem. Ecol.*, **32**, 81-96 (2006).
- Dittmann, E., D.F. Fewer and B.A. Neilan: Cyanobacterial toxins: Biosynthetic routes and evolutionary roots. *FEMS Microbiol. Rev.*, **37**, 23-43 (2013).
- El-Sheekh, M.M., H.M. Khairy and R.A. El-Shenody: Allelopathic effects of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kützling on the growth and photosynthetic pigments of some algal species. *Allelopathy J.*, **26** (2010).
- Erhard, D.: Allelopathy in aquatic environments. In: *Allelopathy: A physiological process with ecological implications* (Eds.: M.J. Reigosa, N. Peñol and L. González). Springer, The Netherlands, pp. 433-450 (2006).
- Gao, Y.N., B.Y. Liu, D. Xu, Q.H. Zhou, C.Y. Hu, F.J. Ge, L.P. Zhang and Z.B. Wu: Phenolic compounds exuded from two submerged freshwater macrophytes and their allelopathic effects on *Microcystis aeruginosa*. *Pol. J. Environ. Stud.*, **20**, 1153-1159 (2011).
- Gross, E.M., C. Legrand, K. Rengefors and U. Tillmann: Allelochemical interactions among aquatic primary producers. In: *Chemical ecology in aquatic systems* (Eds.: C. Brönmark and L.A. Hansson). University Press, Oxford, pp. 196-209 (2012).
- Gross, E., S. Hill, P. Lombardo and G. Mulderij: Searching for allelopathic effects of submerged macrophytes on phytoplankton—state of the art and open questions. In: *Shallow lakes in a changing world* (Eds.: R. Gulati, E. Lammens, N. de Pauw and E. van Donk). Springer, Netherlands, pp. 77-88 (2007).
- Hong-Qiang, W., L. Feng, Q. Ning, D. Jin-Xia, Z. Lie-Yu and G. Yi-Fei: Chemical composition of volatile oil from two emergent plants and their algae inhibition activity. *Pol. J. Environ. Stud.*, **23**, 2371-2374 (2014).
- Ishida, K. and M. Murakami: Kasumigamide, an antialgal peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Org. Chem.*, **65**, 5898-5900 (2000).
- Jia, X.H., D.J. Shi, R.J. Kang, H.M. Li, Y. Liu, Z.Z. An, S.S. Wang, D.H. Song and G.S. Du: Allelopathic Inhibition by *Scenedesmus obliquus* of photosynthesis and growth of *Microcystis aeruginosa*.

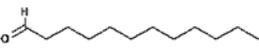
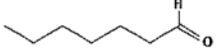
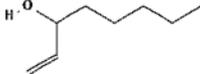
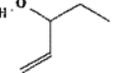
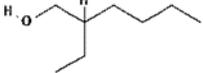
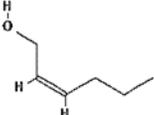
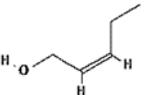
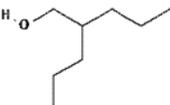
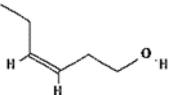
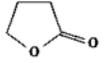
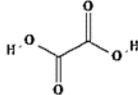
- In: Photosynthesis: energy from the Sun (Eds.: J. Allen, E. Gantt, J. Golbeck and B. Osmond). Springer, the Netherlands, pp. 1339-1342 (2006).
- Kearns, K.D. and M.D. Hunter: Toxin-producing *Anabaena flos-aquae* induces settling of *Chlamydomonas reinhardtii*, a competing motile alga. *Microbial Ecology*, **42**, 80-86, (2001).
- Leflaive, J.P. and L. Ten-Hage: Allelopathic interactions in benthic biofilms: effects of abiotic conditions on production of and sensitivity to allelochemicals. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, **28**, 273-282 (2009).
- Li, F.M. and Y.H. Hu: Isolation and characterization of a novel anti-algal allelochemical from *Phragmites communis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 6545-6553 (2005).
- Li, X., B.S. Cui, Q.C. Yang, Y. Lan, T.T. Wang and Z. Han: Litter quality and interactions of macrophytes tissues decomposition in a eutrophic shallow lake. *Procedia Environ. Sci.*, **13**, 1170-1178 (2012).
- Lin, Q., S.S.S. Sarma and B.P. Han: Effect of cyanobacterium on competition between rotifers: a population growth study. *Inland Waters*, **4**, 319-216 (2014).
- Macias, F., J.L. Galindo, M. García-Díaz and J.G. Galindo: Allelopathic agents from aquatic ecosystems: potential biopesticides models. *Phytochem Rev.*, **7**, 155-178 (2008).
- Nakai, S., G. Zou, X. Song, Q. Pan, S. Zhou and M. Hosomi: Release of anti-cyanobacterial allelochemicals from aquatic and terrestrial plants applicable for artificial floating islands. *J. Water Environ. Technol.*, **6**, 55-63 (2008).
- Neilan, B.A., L.A. Pearson, J. Muenchhoff, M.C. Moffitt and E. Dittmann: Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environ. Microbiol.*, **15**, 1239-1253 (2013).
- NIVA: Estimation of algal growth potential. Norwegian Inst. for Water Res, Publ. D2-25 (1976).
- Rao, B.D., M.R. Babu and N. Ellaswamy: Cyanotoxins and their potential applications. A review. *Nat. Env. Pollu. Technol.*, **14**, 203-9 (2015).
- Rudrappa, T., J. Bonsall, J. Gallagher, D. Seliskar and H. Bais: Root-secreted allelochemical in the noxious weed *Phragmites australis* deploys a reactive oxygen species response and microtubule assembly disruption to execute rhizotoxicity. *J. Chem. Ecol.*, **33**, 1898-1918 (2007).
- Sampietro, D.A., C.A. Catalan and M.A. Vattuone: Isolation, identification and characterization of allelochemicals/natural products. Science Publishers. (2009).
- Sheng-hua, Z., G. Li, C. Jin-yan and C. Jun-jun: Allelopathic activities of three emergent macrophytes on several monospecific cyanobacterial species and natural phytoplankton assemblages. *Pol. J. Environ. Stud.*, **24**, 397-402 (2015).
- Staub, R.: Ernährungsphysiologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* D.C. *Schweiz Z Hydrogr.*, **23**, 82-198 (1961).
- Švanys, A., R. Paškauskas and S. Hilt: Effects of the allelopathically active macrophyte *Myriophyllum spicatum* on a natural phytoplankton community: A mesocosm study. *Hydrobiologia*, **737**, 57-66 (2014).
- Thorpe, A.S., E.T. Aschehoug, D.Z. Atwater and R.M. Callaway: Interactions among plants and evolution. *J. Ecol.*, **99**, 729-740 (2011).
- Uddin, M.N., D. Caridi and R.W. Robinson: Phytotoxic evaluation of *Phragmites australis*: an investigation of aqueous extracts of different organs. *Mar. Freshw. Res.*, **63**, 777-787 (2012).
- Weston, L.A., P.R. Ryan and M. Watt: Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere. *J. Exp. Bot.*, **63**, 3445-3454 (2012).
- Yang, J., X. Deng, Q. Xian, X. Qian and A. Li: Allelopathic effect of *Microcystis aeruginosa* on *Microcystis wesenbergii*: microcystin-LR as a potential allelochemical. *Hydrobiologia*, **727**, 65-73 (2014).

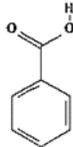
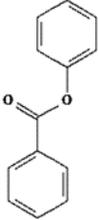
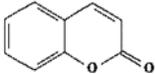
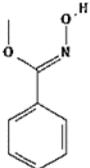
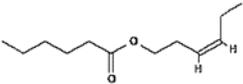
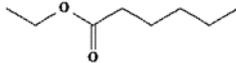
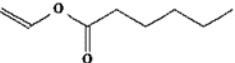
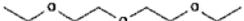
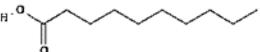
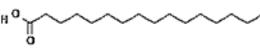
ANEXO 2

Compuestos orgánicos volátiles de *Phragmites*

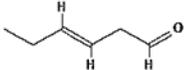
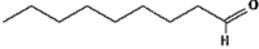
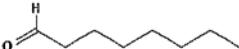
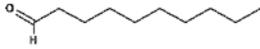
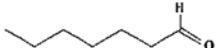
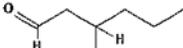
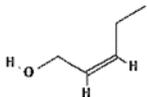
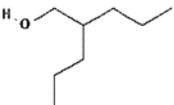
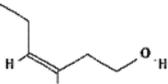
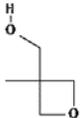
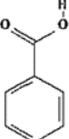
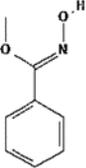
| Estructura molecular de compuestos obtenidos del Perfil químico de <i>Phragmites</i> en hoja | | | |
|---|--|--|--|
| (E)-2-butenilciclopropano 1  | 1,3-hexadieno, 3-etil-2-metil- 2  | 1-ciclohexeno-1-carboxaldehído, 2,6,6-trimetil- 3  | 2-hexeno, 3,5,5-trimetil- 4  |
| 5,9-undecadien-2-ona, 6,10-dimetil-, (E)- 5  | 5-hepten-2-ona, 6-metil- 6  | 3-careno 7  | Etanona, 1-(3,4-dimetilfenil)- 8  |
| Furano, 2-etil- 9  | Furano, 2-pentil- 10  | Furano, 2-propil- 11  | 2,3-Octanodiona 12  |
| Ciclobutanona, 2,2,3-trimetil- 13  | Ciclobutanona, 2,2-dimetil- 14  | 1-penten-3-ona 15  | 2-nonanona 16  |
| 3-octanona | 3-pentanona | Benzofenona | Trans-beta-ionona |

| | | | |
|---|---|--|--|
| 17  | 18  | 19  | 20  |
| 2,4-heptadienal, (E, E)- 21  | 2,4-hexadienal, (E,E)- 22  | 2,6-nonadienal, (E,E)- 23  | 2-butenal, 3-metil- 24  |
| 2-heptenal, (E)- 25  | 2-hexenal 26  | 2-hexenal, (E)- 27  | 2-nonenal, (E)- 28  |
| Nonanal 29  | 2-octenal, (E) - 30  | Octanal 31  | 2-pentenal, (E)- 32  |
| 4-etil-2-hexinal 33  | 4-heptenal, (E)- 34  | 4-heptenal, (Z)- 35  | Decanal 36  |
| Dodecanal | Heptanal | Hexanal | 1-heptanol |

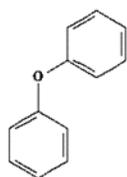
| | | | |
|--|--|--|--|
| 37  | 38  | 39  | 40  |
| 1-hexanol 41  | 1-nonanol 42  | 1-octanol 43  | 1-octen-3-ol 44  |
| 1-pentanol 45  | 1-penten-3-ol 46  | 2-etil-1-hexanol 47  | 2-hexen-1-ol, (Z)- 48  |
| 2-penten-1-ol, (Z)- 49  | 2-propil-1-pentanol 50  | 3-hexen-1-ol, (Z)- 51  | Ciclohexanol 52  |
| Glicidol 53  | Ácido acético 54  | Butirolactona 55  | Ácido oxálico 56  |
| Ácido benzoico | Ácido benzoico, éster fenílico | Anhídrido cumarínico | Oxima-, metoxi-fenil- |

| | | | |
|--|---|---|--|
| 57  | 58  | 59  | 60  |
| Ácido hexanoico, éster 3-hexenílico, (Z)- 61  | Ácido hexanoico, éster etílico 62  | Éster vinílico del ácido n-caproico 63  | Dietil carbitol 64  |
| Dimetil éter 65  | Ácido n-decanoico 66  | Ácido n-hexadecanoico 67  | |

| Estructura molecular de compuestos obtenidos del Perfil químico de <i>Phragmites</i> en tallo | | | |
|---|--|--|---------------------------------------|
| 1,3-hexadieno, 3-etil-2-metil- 1 | 5,9-undecadien-2-ona, 6,10-dimetil-, (E)- 2 | 5,9-undecadien-2-ona, 6,10-dimetil-, (Z)- 3 | 5-hepten-2-ona, 6-metil- 4 |
| | | | |
| Ciclobutano, butil- 5 | Ciclopropano, propil- 6 | Eteno, fluoro- 7 | Furano, 2-pentil- 8 |
| | | | |
| Pentano, 1-cloro- 9 | Trans-beta-ocimeno 10 | 1-penten-3-ona 11 | 3-butylisobenzofurano-1(3H)-ona 12 |
| | | | |
| 3-pentanona 13 | Ciclopentanona 14 | Etanona, 1-(2,4-dimetilfenil)- 15 | Etanona, 1-(2,5-dimetilfenil)- 16 |
| | | | |
| Etanona, 1,1'-(1,4-fenileno)bis- 17 | 2-hexenal 18 | 2-hexenal, (E)- 19 | 2-octenal, (E) - 20 |
| | | | |

| | | | |
|--|---|--|--|
| 3-hexenal 21  | Nonanal 22  | Octanal 23  | Decanal 24  |
| Heptanal 25  | Hexanal  | Hexanal, 3-metil- 27  | 1-heptanol 28  |
| 1-hexanol 29  | 1-nonanol 30  | 1-pentanol 31  | 2-penten-1-ol, (Z) - 32  |
| 2-propil-1-pentanol 33  | 3-hexen-1-ol, (Z)- 34  | 3-metil-3-oxetanometanol 35  | Ciclobutanol 36  |
| Ácido acético 37  | Ácido fórmico 38  | Ácido benzoico 39  | Oxima-, metoxi-fenil- 40  |
| Difenil éter | Ácido n-hexadecanoico | | |

41



42

