

# INFORME DE PRÁCTICA PROFESIONAL

*“Utilización de la microalga *Scenedesmus brevispina* cultivada en efluente de matadero como bioestimuladora en la germinación de semillas de *Pappostipa humilis* (Coirón llama) para la revegetación de ambientes degradados en la Provincia del Chubut”*



UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE LA  
PATAGONIA SAN JUAN  
BOSCO

Facultad de Ciencias  
Naturales y de la Salud

Sede Trelew

**Licenciatura en Protección y  
Saneamiento Ambiental**

**Alumna: Miras Gagliardi, María Belén**

**Instructor: Lic. Cravero, Marcela Alejandra**

**Profesor Asesor: Ing. Salomón, Ruth.**

**Año: 2021**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO

Facultad de Ciencias Naturales y de la Salud- Sede Trelew



## INFORME DE PRÁCTICA PROFESIONAL

Licenciatura en Protección y Saneamiento Ambiental

**“Utilización de la microalga *Scenedesmus brevispina* cultivada en efluente de matadero como bioestimuladora en la germinación de semillas de *Pappostipa humilis* (Coirón llama) para la revegetación de ambientes degradados en la Provincia del Chubut”**

Alumna: Miras Gagliardi, María Belén



Instructor: Lic. Cravero, Marcela Alejandra

Profesor Asesor: Ing. Salomón, Ruth

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Microalgas de la Facultad de Ciencias Naturales y de la Salud de la UNPSJB Sede Trelew.

Año: 2021

Contacto: [belu91miras@hotmail.com/](mailto:belu91miras@hotmail.com) [bellmiras@gmail.com](mailto:bellmiras@gmail.com)

## ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>2</b>
<b>1 Resumen</b> .....	<b>3</b>
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>3</b>
2.1 Objetivo general .....	3
2.2 Objetivos particulares .....	3
<b>3 Introducción</b> .....	<b>3</b>
<b>4 Materiales y métodos</b> .....	<b>6</b>
4.1 Acondicionamiento del material. ....	6
4.2 Toma de Muestra del Efluente .....	15
4.3 Filtrado y esterilización del efluente: .....	16
4.4 Preparación del cultivo: .....	17
4.5 Curvas de crecimiento y Recuento celular .....	18
4.6 Separación de la Biomasa .....	21
4.7 Preparación de extractos .....	25
4.8 Caracterización y acondicionamiento de semillas .....	28
4.9 Ensayos de bioestimulación .....	31
4.10 Análisis Estadístico.....	34
<b>5 Resultados y discusión</b> .....	<b>35</b>
<b>6 Conclusión</b> .....	<b>44</b>
<b>7 Referencias Bibliográficas</b> .....	<b>45</b>
<b>8 Anexos</b> .....	<b>48</b>
8.1 ANEXO A: Planilla de recuento celular. ....	48
8.2 ANEXO B: Planilla de seguimiento de germinación. ....	49

## **AGRADECIMIENTOS.**

---

Dicen que “un gran maestro no es aquel que enseña algo, sino aquel que inspira al alumno a dar lo mejor de sí, para descubrir un conocimiento que ya tiene dentro de su alma” y que “debes elegir por maestro a alguien a quien admires, más por lo que en él vieres que por lo que escuches de sus labios”. Estas líneas me inspiran a recordar con simpleza mis años de vida transcurridos desde mi infancia hasta el día de hoy. Desde pequeña tuve en mi vida distintos maestros que fueron mi guía y el mejor ejemplo a seguir, mis padres Marisa y Luis, mi hermano Fernando y mis abuelos Horacio, Angela, Teresita y Héctor. Mi infancia vivenciada en el campo forjó mi sensibilidad y pasión por la naturaleza y los seres vivos, como así también la importancia de su protección, que hasta ese entonces sólo era un disfrute diario. Esa sensibilidad marcó mi vida a lo largo de los años haciendo que decidiera formarme académicamente y encaminarme en el mundo de la biología y las ciencias naturales.

A mis grandes maestros quiénes me acompañaron durante toda mi carrera académica:

A mi Instructora y Profesora Asesor, Marcela Cravero y Ruth Salomón, gracias por la paciencia, el tiempo dedicado, transmisión de conocimientos y vivencias.

A Isabel Albarracín por aceptarme y brindarme el lugar de trabajo en el Laboratorio de Microalgas de UNPSJB sede Trelew y realizar mi Práctica Profesional, como así también su conocimiento y experiencia en el mundo de la Ficológia.

Al grupo del vivero de la Estación Experimental INTA de Trelew, que colaboraron conmigo y la realización de la práctica.

A Cynthia González del Herbario de la UNPSJB sede Trelew por ser tan atenta a resolver mis dudas e incertidumbres con los pastos.

A todos mis compañeros de cursada, gracias por tantas horas compartidas, vivencias y el compañerismo brindado. En especial, a mis compañeros de laboratorio Matías y Daniela, por ser tan buenos compañeros y ahora grandes amigos, siempre con alguna palabra de aliento y horas extras ayudándome.

A todos mis amigos más allegados y familiares, muchas gracias por ser siempre ese apoyo tan incondicional y algunos aún en la distancia hacerse sentir tan cerca.

Finalizando quisiera dedicar este trabajo a toda mi familia, pero en especial a mi abuelo Horacio Gagliardi, quién hace poco partió de este plano y fue una de las personas que más confiaba en mis ideas y locuras en pos de una nueva era amigable con el medio ambiente. Sé que seguirás guiando mis pasos desde donde estés como siempre lo hiciste abuelo.

Muchísimas gracias a todos, gracias a ustedes, hoy soy la persona que soy.

## 1 RESUMEN.

---

En el presente informe se describen los procedimientos empleados y resultados obtenidos a partir del crecimiento de *Scenedesmus brevispina* en efluente de matadero con posterior cosecha de la biomasa para ser utilizada en la elaboración de extractos con ruptura celular, sin ruptura celular y en base etanólica. Para así, evaluar la capacidad de estimular y aumentar el poder germinativo de pastos nativos, como ser *Pappostipa humilis*, conocido como “Coirón llama”, utilizado para revegetar zonas degradadas de la Provincia del Chubut. En general se observó una estimulación de la germinación en los tratamientos con cultivos de microalga con y sin sonicar, pero una inhibición en la germinación en los ensayos con extractos etanólicos. En particular el Tratamiento 10 (cultivo sin sonicar) y el Tratamiento 11 (Cultivo con ruptura) son los que presentan mayor Poder germinativo y Energía de germinación, 48,89 % y 22,69 %, respectivamente.

## 2 OBJETIVOS.

---

### 2.1 Objetivo general

Determinar la capacidad bioestimulante de *Scenedesmus brevispina* en la germinación de semillas de la poácea *Pappostipa humilis* para revegetar ambientes degradados de la provincia del Chubut.

### 2.2 Objetivos particulares

- Realizar el cultivo microalgal en el efluente de matadero y cosechar la biomasa.
- Evaluar la capacidad de estimular la germinación de semillas de *P. humilis* con el cultivo algal y distintas concentraciones de los extractos de la biomasa.

## 3 INTRODUCCIÓN

---

La práctica profesional se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Microalgas de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud UNPSJB sede Trelew, y en conjunto con el Vivero de la Estación Experimental INTA de la ciudad de Trelew.

Se trabajó con cepas de microalgas de la especie *Scenedesmus brevispina* (GMSmith) Chodat (dulceacuícola) cultivadas en efluentes orgánicos pertenecientes a un matadero de la ciudad de Gaiman, Chubut, y con semillas

de la especie *Pappostipa humillis* (Cav.) Romasch (coirón llama) provistas por el banco de germoplasma del vivero de INTA.

Se propone determinar la capacidad bioestimulante de la microalga en la germinación de semillas del Coirón Llama, para ser utilizadas en procesos de revegetación de ambientes degradados.

Los efluentes orgánicos pertenecen a la laguna de tratamiento del matadero (efluente final) provenientes del lavado de salas y equipos, comúnmente denominado *efluente mixto*, previa separación de lodos y sólidos en un sedimentador.

#### FUNDAMENTACIÓN

Las microalgas son un conjunto de organismos autótrofos unicelulares o pluricelulares que carecen de organización morfológica compleja. Tienen la particularidad de ser los productores primarios de los ambientes acuáticos como así también continentales, ya que son los responsables de producir a escala mundial, alrededor de la mitad del oxígeno por fotosíntesis.

Una de las aplicaciones importantes de las microalgas, es el tratamiento de aguas residuales en la utilización y transformación de los nutrientes a biomasa, con la consecuente producción de oxígeno, para mejorar la calidad del efluente, así como la disponibilidad de éste para la continua oxidación bacteriana de la materia orgánica en sistemas integrales, mediante el ciclo de oxigenación fotosintética de aguas residuales. Producen biomasa y metabolitos secundarios. Entre estas sustancias se pueden citar: vitaminas, enzimas, carbohidratos, péptidos, aminoácidos y sustancias promotoras o inhibitoras del crecimiento (Tassara *et al.*, 2012).

El tratamiento de las aguas residuales requiere de gran atención debido a las descargas que se realizan en la actualidad a cuerpos de agua ocasionando serios problemas de contaminación colateral, eutrofización e incluso la muerte de algunos sistemas acuáticos, recibiendo niveles de materia orgánica superiores a la capacidad de autodepuración de los ecosistemas.

Resulta de gran importancia el cuidado y recuperación del agua por ser el elemento imprescindible para el desarrollo de la vida, aún más en zonas de

ambientes áridos o semiáridos característicos de una gran superficie de la provincia del Chubut como de toda la Región Patagónica.

Las características de los vertidos se encuentran regulados en la Provincia del Chubut, a través del Decreto Reglamentario 1540/16 de la Ley XI N° 35 de Código Ambiental Provincial, el cual establece la regulación de la preservación, conservación, defensa y mejoramiento del ambiente de la Provincia. El Estado debe legislar en materia de emisiones estableciendo las directrices para la preservación de los recursos, recalcando los límites permisibles de los distintos parámetros que caracterizan a los efluentes líquidos que serán descargados a los cuerpos receptores hídricos. Todo dependerá del tipo de vuelco según la actividad y el posterior uso que tenga el agua tratada.

Las cepas que se utilizan en el tratamiento de aguas residuales se caracterizan por adaptarse a elevadas concentraciones de nutrientes contenidos en las aguas residuales (necesaria para el crecimiento poblacional), una capacidad de resistir variaciones ambientales y un desarrollo de cultivo en fase exponencial. Ejemplares que cumplen con estas características son *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson, *Chlorella miniata* (Kützing) Oltmanns, *Chlorella vulgaris* Beyerinck y *Chlorella sorokiniana* Shihira y RWKrauss, entre otras.

Por lo tanto, la gran importancia del uso de las mismas radica en ser una tecnología amigable con el medio ambiente, ya que, en comparación con otros tratamientos de efluentes, es de mediano costo, utiliza residuos, y aprovecha energía limpia (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

Investigaciones recientes muestran que el uso de cianobacterias y microalgas como biofertilizantes han aumentado de forma significativa el poder germinativo de monocultivos y sus procesos metabólicos internos, como así también la capacidad antifúngica (Faheed y Abd-Elfattah, 2008), el mejoramiento de la estructura del suelo y la actividad exoenzimática (Zaccaro de Mule *et al.*, 1999; Tassara *et al.*, 2012).

Existe evidencia que las microalgas y sus medios de cultivo contienen sustancias promotoras de crecimiento denominadas fitohormonas (Molnar y

Ördög, 2005; Stirket *al.*, 2013) además poseen un contenido interesante de micro y macro nutrientes (Becker, 2007), los cuales, en conjunto, tienen el potencial de mejorar la disponibilidad de nutrientes, logrando promover cultivos más robustos y saludables.

La zona de la Provincia del Chubut, como la Región Patagónica, presenta ambientes áridos y semiáridos en grandes extensiones donde los procesos erosivos provocan grandes impactos en los suelos. Estas tierras han sufrido sobrepastoreo de pastizales nativos por manejos inadecuados, actividades extractivas mineras, que ha incrementado la pérdida de cobertura vegetal trayendo aparejado el inicio de procesos erosivos, pérdida de biodiversidad, cambios en la dinámica del agua, entre otros problemas (Beider, 2012). Por todo lo expuesto, es de suma importancia implementar métodos y medidas, para recuperar y conservar estos ambientes.

La semilla seleccionada, *Pappostipa humilis* (coirón llama), posee un gran potencial en las tareas de revegetación ya que ejerce un rol fundamental en la protección del suelo reduciendo los procesos erosivos; disminuyendo el escurrimiento, la pérdida de nutrientes y la pérdida de agua del suelo por evaporación. El rango de poder germinativo de esta especie está entre un 40 a 60% dependiendo de la población evaluada. Contar con un tratamiento previo a la germinación que aumente este rango se traducirá en un mayor rendimiento de las semillas colectadas y los plantines obtenidos (Griffiths *et al.*, 1983; Beider, 2012; Rodríguez Araujo y Pérez, 2015).

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS.**

---

### **4.1 Acondicionamiento del material.**

En el laboratorio se utiliza una gran diversidad de materiales que varían de acuerdo a su composición (vidrio, cerámica, metales, plásticos) lo que hará que las técnicas de limpieza y manipulación sean diferentes.

Aunque a veces el acondicionamiento del material y las técnicas que se apliquen parezcan superfluas, son de gran importancia ya que influyen en gran medida en el resultado final de cualquier práctica experimental que se lleve a cabo.

Para la realización de esta práctica profesional, se utilizaron utensilios de vidrio, plástico y algunos equipamientos (Figura 1).

**Detalle de materiales:**

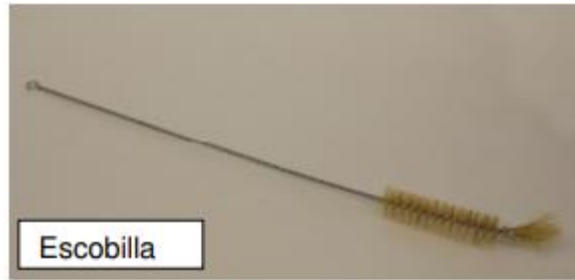
Material de Vidrio	Material de Plástico	Equipamiento
<ul style="list-style-type: none"><li>• Frascos Erlenmeyer</li><li>• Placas de Petri</li><li>• Pipeta de Pasteur</li><li>• Pipetas graduadas</li><li>• Varillas</li><li>• Probetas</li><li>• Vasos de precipitados</li><li>• Tubos de ensayo</li><li>• Embudos</li><li>• Cámara de Neubauer</li><li>• Desecador</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Placas de Petri</li><li>• Bidones</li><li>• Botellas</li><li>• Bandejas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Microscopio</li><li>• Balanza</li><li>• Escobillas</li><li>• Centrífuga</li><li>• Autoclave</li><li>• Estufa</li><li>• Sonicador</li><li>• Lupa</li></ul>



Pipetas graduadas



Embudo



Escobilla



Caja Petri



Desecador



Balanza



Aro

Nuez

Pinzas

Soporte

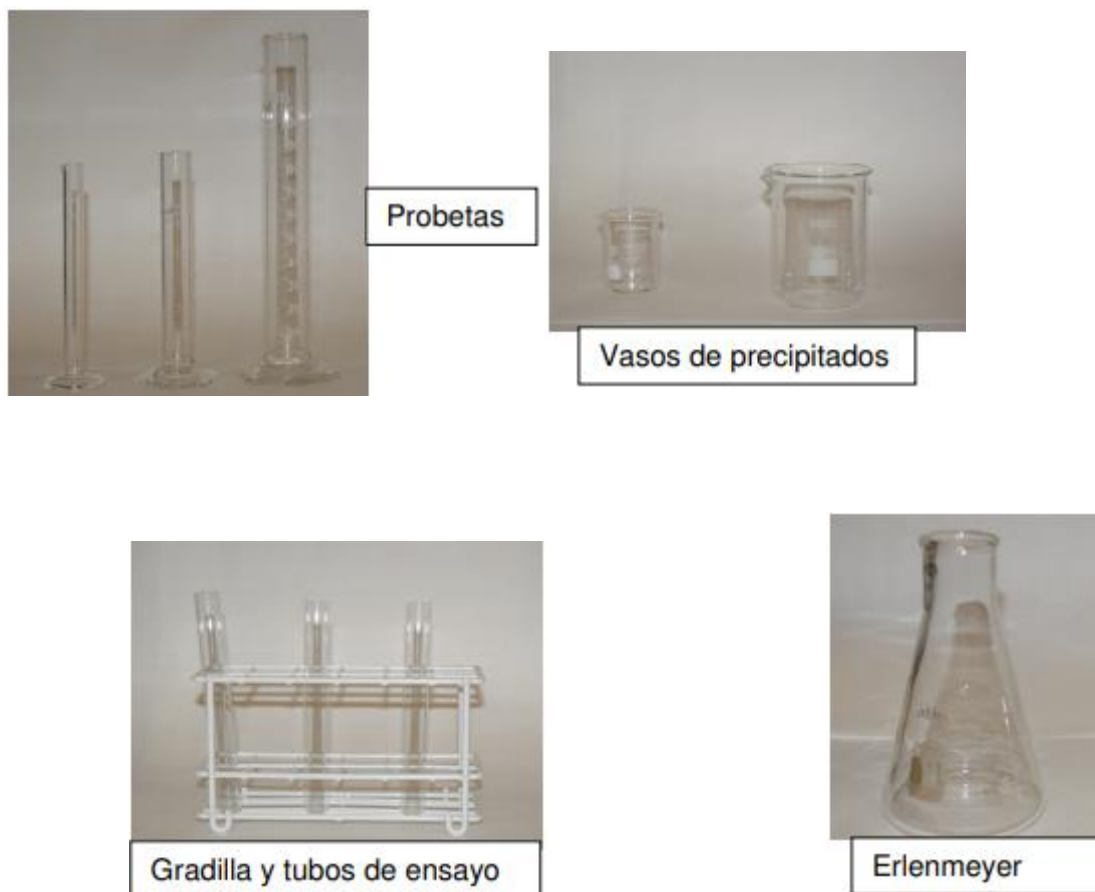


Fig. 1. Materiales utilizados

Los procesos de limpieza y sanitización que se utilizaron son: lavado, secado y esterilización por calor húmedo, calor seco y esterilización química.

### Lavado de material de vidrio

El lavado correcto del material es un aspecto fundamental a la hora de trabajar con cultivos microalgales ya que cualquier sustancia puede influir en los distintos parámetros de desarrollo y por lo tanto afectan los resultados de análisis. El vidrio es el material adecuado para soportar todos los procesos de limpieza y esterilización habiendo en el mercado una gran variedad de marcas de vidrio borosilicato como Pyrex kimax, Phoenix, entre otros. (Apuntes de cátedra de Toxicología y Salud Ambiental, 2017).

El material a utilizar debe estar libre de cualquier tipo de rótulos y en buenas condiciones.

La finalidad del lavado es dejar el material neutro para su uso, por lo tanto, se utilizan detergentes especiales que eliminan toda materia orgánica presente.

En el caso que se utilicen detergentes comunes es necesario que el lavado se realice de forma minuciosa ya que suelen dejar componentes que pueden llegar a ser tóxicos.

La forma de lavado que se utilizó es el proceso de enjuague de 3 veces con agua corriente y una dilución 1:5 de detergente especial, uso de escobilla y/o cepillo manual. Finalmente se realiza un enjuague de 2 ó 3 veces con agua bidestilada.

En el caso de los recipientes con incrustaciones, se procedió a enjuagarlos con solución de HCl de concentración 1 N y luego se los lavó siguiendo las indicaciones anteriormente nombradas.

Cabe destacar que la cristalería nueva que no viene estéril de fábrica, puede contaminarse con esporas que provienen del material de empaque, o de un film residual de álcali. Por lo tanto, es necesario sumergir el material de vidrio nuevo en una solución de HCl 1 N durante la noche, para neutralizar parcialmente el álcali contenido en el vidrio.

### **Secado**

Se debe realizar lo más rápido posible luego del lavado para evitar una contaminación posterior. El material de vidrio lavado se deja secar boca abajo sobre recipientes cubiertos con papel absorbente y se cubren con papel para evitar el ingreso de cualquier partícula de polvo circundante.

### **Esterilización**

La esterilización de los medios de cultivo, recipientes e instrumentos es esencial para el mantenimiento de los cultivos.

Aunque a veces los términos esterilización y desinfección se asumen como sinónimos, hay diferencias fundamentales entre ellos.

El término **esterilización** está normalmente reservado a procesos que aseguran la completa inactivación reproductiva de todos los microorganismos presentes ya sea por destrucción o remoción. Es un proceso *bactericida*.

El término **desinfección** es tomado como una medida de reducción del número de bacterias a un nivel aceptable. Implica una parcial esterilización. Es *bacteriostático*.

- **Esterilización por vía húmeda:**

Es el método más eficaz para esterilizar medios de cultivo capaces de soportar elevadas temperaturas sin descomponerse. Para ellos se utilizó la autoclave. La temperatura que se consigue dentro de la misma, depende de la presión del vapor. Es importante asegurarse que todo el aire haya sido eliminado antes de comenzar el proceso de esterilización, ya que una mezcla de aire y vapor da como resultado una temperatura más baja a determinada presión. La temperatura de esterilización se alcanza a los 121°C (1,5 atm).

Para asegurar la esterilidad, el vapor debe penetrar los materiales por lo que es necesario recubrir los mismos de manera que permita el acceso del vapor. Se recomienda el uso de un papel no graso. El tiempo de esterilización depende de los volúmenes del medio tratado.

Un volumen de 50-100 ml requiere aproximadamente 20-25 minutos para alcanzar la temperatura de esterilización, mientras que entre 2 y 5 litros requieren 30-40 minutos.

La autoclave es un aparato que consiste de un cilindro vertical u horizontal, de paredes resistentes provisto de una tapa que asegura el cierre hermético, y del correspondiente manómetro y termómetro (Figura 2).

El agua necesaria para la generación de vapor se almacena en un reservorio dentro de él o a veces afuera. Como se trata de un recipiente hermético, la presión del vapor en el interior, puede aumentarse hasta el límite conveniente que por lo general es de 1 a 1,5 atmósferas sobre lo normal. Tiene un rango de temperatura entre 115 y 135°C

Procedimiento:

- ☞ Se debe comprobar si hay suficiente agua en el fondo de la autoclave o en el generador de vapor.

- ☞ Introducir el material a esterilizar, evitando el acondicionamiento compacto que produciría la rotura de los tubos o frascos.
- ☞ Se debe cubrir los tapones con papel de aluminio para evitar que se moje el algodón y evitar que se diluya el medio de cultivo contenido en los recipientes.
- ☞ Una vez cerrada la autoclave, se inicia el calentamiento dejando la espita abierta, a fin de dejar escapar el aire almacenado. La válvula de seguridad se habrá ajustado previamente a la presión requerida.
- ☞ Cuando el aire ha sido expulsado, lo que se nota porque el vapor sale en forma continua, se cierra la espita y se continúa el calentamiento hasta lograr la temperatura deseada. En este momento empezará a funcionar la válvula de seguridad dejando escapar el vapor en exceso. El tiempo de esterilización se cuenta a partir del momento que el termómetro indica la temperatura establecida.
- Terminado el período de esterilización, se suspende el calentamiento y se deja enfriar espontáneamente hasta que el manómetro indique la presión atmosférica.

Este proceso de esterilización se utilizó en el medio de cultivo de la muestra de matadero (apartado 4.3 filtrado y esterilización del efluente).

- ***Esterilización por calor seco:***

La esterilización por calor seco requiere el uso de temperaturas mayores que las que se emplean durante los métodos de calor húmedo. Está restringido a materiales estables al calor, como el material de vidrio o metálico. Tiene además la ventaja que si la temperatura empleada es suficientemente alta se logra una completa destrucción de la materia orgánica. Esto es beneficioso para aquellos bioensayos o intentos de cultivar formas que son sensibles a trazas orgánicas contaminantes.

Se usa estufa u horno que se calienta por gas o electricidad y que está controlada termostáticamente.

Se utilizó la estufa para la esterilización en seco. El material de vidrio debe estar seco antes de colocarse en la misma. La carga de la estufa debe hacerse

cuando está fría, dejando espacios libres alrededor de los objetos y entre ellos para una buena circulación del aire. Los recipientes metálicos que contienen las pipetas o los frascos deben disponerse en la parte inferior. Y los canastos con material envuelto en papel en la parte superior, a fin de evitar la parcial carbonización que sufre el papel por la excesiva temperatura.

El tiempo de esterilización es preferentemente de tres horas que se cuentan a partir del momento en que el termómetro de la estufa marca 150° C.

Una vez que se enfría la estufa se procede a retirar el material y almacenarlo hasta el momento de su uso en armarios con cierre hermético.

Existen otros métodos de calor seco que no necesariamente aseguran esterilidad; son desinfectantes. Se utilizan mecheros Bunsen o lámparas de alcohol, para flamear ansas y agujas en el caso de inoculación.

También se sumergen en alcohol seguido de flameo, instrumentos que pueden ser dañados con demasiado calor.

#### Preparación del material de vidrio y otras sustancias para la esterilización

Antes de ser sometidos a esterilización, los tubos de ensayo, matraces y frascos deben taponarse con algodón graso, no absorbente de forma que el tapón ajuste perfectamente. El tapón de algodón persigue la doble finalidad de evitar el polvo y permitir la difusión gaseosa en el cultivo.

Para preparar el tapón se separan varias capas de fibras de algodón disponiéndose perpendicularmente y enrollándolos. Luego se lo cubre y ajusta con una fina tela de gasa e hilo de algodón enrollándolo en un extremo del tapón, luego se cortan los excedentes de tela de gasa e hilo.

Las pipetas también deben taponarse con algodón a efectos de evitar posible contaminación con el aliento.

Las cajas de Petri y las pipetas que se van a esterilizar en hornos o estufas de aire caliente se colocan en envases metálicos o bien se envuelven individualmente en papel de strass.

Los medios de cultivo que se esterilizan en autoclave o en corriente de vapor deben cubrirse con papel poroso para lograr una efectiva penetración del

vapor. También puede usarse papel de aluminio aplicado en forma floja, y al retirar de la autoclave se presiona.

En el caso de tubos con tapas a rosca, se cierran dejando a los mismos ligeramente flojos. Después del esterilizado y ya fuera de la autoclave, y fríos, se ajustan.

Para esterilizar muestras de agua se pueden utilizar recipientes de teflón.

- **Esterilización química:**

Se refiere a diversos agentes químicos cuya acción es desinfectante. Pero en general son productos tóxicos; por lo tanto, su uso debe realizarse con precaución.

Se pueden clasificar en desinfectantes no volátiles y volátiles.

Los primeros se usan con el objetivo de reducir la carga microbiana en superficies e instrumentos. Estos agentes son soluciones que pueden ser aplicadas directamente en las superficies o también donde los instrumentos pueden sumergirse.

El tiempo de aplicación es variable, **hipoclorito de sodio**, **alcohol etílico**, son los más usados. Dentro de los desinfectantes volátiles se puede mencionar el **cloroformo**, el **óxido etileno** y el **b-propiolactano**. El cloroformo causa daño a los tejidos en una exposición prolongada. Tiene efecto acumulativo y el óxido de etileno es muy reactivo y explosivo. En el laboratorio de Microalgas se usan hipoclorito de sodio y alcohol etílico al 96% o en otras diluciones, por ejemplo, para desinfectar recipientes de plástico y mesadas se utiliza una solución de alcohol etílico al 70%.

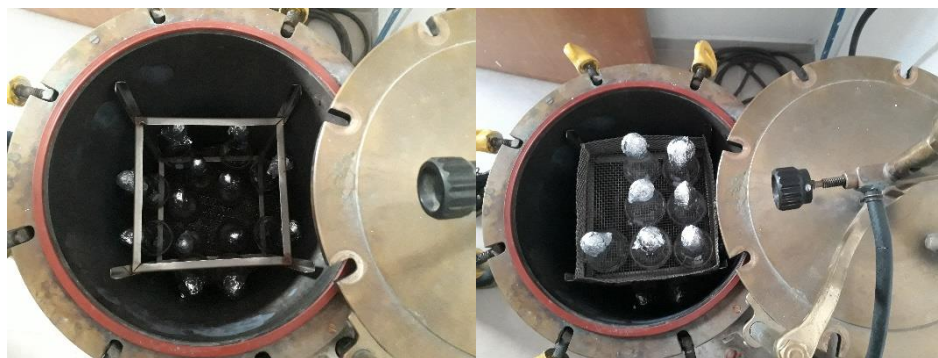


Fig. 2. Esterilización húmeda de medios de cultivo en autoclave.



Fig. 3. Esterilización en seco en estufa.

## 4.2 Toma de Muestra del Efluente

El objetivo de la toma de muestras es la obtención de una porción de material cuyo volumen sea pequeño para ser transportado y representativo del cuerpo de agua que se desea muestrear, de modo que de ello dependerá el método de muestreo a realizar. A la hora de su realización es necesario tener en cuenta distintas consideraciones para disminuir errores en los análisis. La zona del cuerpo de agua (superficie, zona de mezcla o fondo), las condiciones climáticas, y el horario del día donde se realice el muestreo son fundamentales, por ejemplo, se debe evitar realizar el muestreo en días lluviosos ya que la muestra estará diluida.

La muestra de efluente de matadero (Figura 5) que se utilizó como medio de cultivo para el crecimiento de *Scenedesmus brevispina*, se muestreó en invierno en horario matutino, bajo las indicaciones de tomas de muestras de métodos normalizados 1060 A del standard method (Clesceri LS, *et al*; 1992). Según el mismo se realizó una muestra de sondeo con el método manual, de la cual se tomaron distintos parámetros: pH, conductividad, temperatura, sólidos totales, oxígeno disuelto. La muestra pertenece a una laguna (Figura 4) de un matadero de la ciudad de Gaiman.



Fig. 4. Laguna de estabilización del matadero de la ciudad de Gaiman.



Fig. 5. Toma de muestra de efluente de matadero con filtrado grueso.

### 4.3 Filtrado y esterilización del efluente:

Se realizó un doble filtrado grueso (Figuras 6 y 7) a la muestra de efluente previo a ser utilizada como medio de cultivo, con la finalidad de retener la mayor cantidad de material particulado y restos orgánicos que pudieran interferir posteriormente en el proceso de recuento celular.

Uno de los filtrados se realizó in situ (Figura 5) a la toma de muestra utilizando un bidón de 5 L con un embudo con gasa y algodón. Y el segundo filtrado

(Figuras 6 derecha y 7) se realizó en las instalaciones del laboratorio previo al proceso de esterilización.

El esterilizado del efluente se realizó por vía húmeda con un volumen de 3 L a 0,5 atm de presión manométrica durante un tiempo de 45 minutos.



Fig. 6 Izquierda: efluente crudo prefiltrado; Derecha: preparación para 2do filtrado.



Fig. 7. Efluente con 2do filtrado.

#### 4.4 Preparación del cultivo:

Para la preparación del cultivo se utilizó como medio del mismo, 2,5 L del efluente de matadero previamente esterilizado y filtrado, y se le agregó 110 ml de inóculo de *Scenedesmus brevispina* (Figura 8 izquierda). Esta cepa fue

previamente aislada y adaptada al efluente de matadero durante años por parte del grupo que trabaja en el Laboratorio de Microalgas de la UNPSJB sede Trelew.

Se realizaron 3 réplicas de cultivo (Figura 8 derecha), por lo tanto, cada bidón de 3 L tenía un volumen final de 2,610 L (2,5L de medio + 110 ml de inóculo).

Se dejó en cámara de cultivo para su crecimiento y posterior recuento celular hasta alcanzarse un valor considerable de biomasa algal, logrado a los 8 días de haberse iniciado el cultivo. La temperatura de la cámara se mantuvo en  $23 \pm 2$  °C con agitación manual diaria.



Fig. 8. Izquierda: inóculo; Derecha: inicio del crecimiento (Cultivo de 2,5L+ inóculo) con réplicas.

#### 4.5 Curvas de crecimiento y Recuento celular

Para la evaluación del crecimiento microalgal en los cultivos es necesario monitorear el aumento poblacional durante un período de tiempo estimado. Para ello, se determina la densidad celular y la masa seca. Para evaluar la densidad celular y realizar el conteo, se utilizó una Cámara de Neubauer (Figura 9 izquierda), que consta de un portaobjetos adaptado para observarse al microscopio y cuenta con la delimitación de cuadrículas (Figura 9 derecha) de dimensiones conocidas (1 mm<sup>2</sup> de superficie). En la retícula central, la cámara tiene un cuadrado primario que contiene nueve cuadrados secundarios, cada uno de ellos a su vez se divide en 16 cuadrados terciarios. El cuadrado

secundario central contiene, no 16, sino 25 cuadrados y cada uno de ellos se dividen a su vez en 16 cuadrados cuaternarios.

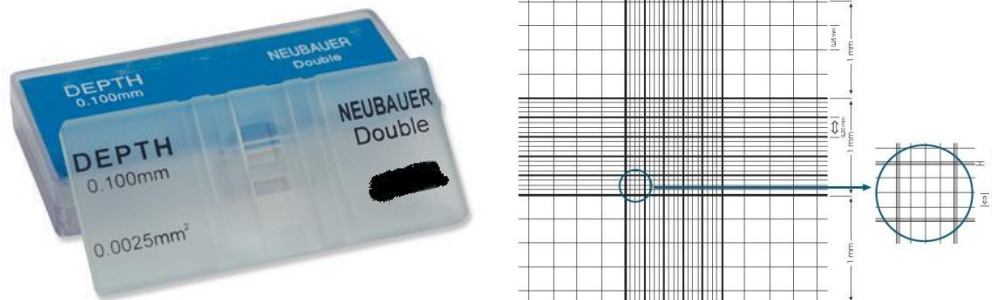


Fig.9. izquierda: cámara de Neubauer, Derecha: observación de las cuadrículas de la cámara en el microscopio.

Durante 8 días se tomó una muestra del cultivo de cada réplica, se fijó con lugol y se realizó el recuento. Se le adhirió a la cámara un cubreobjeto, y con la ayuda de una pipeta Pasteur se la cargó con la muestra de cultivo. Utilizando el microscopio se contó la cantidad de células que se observaron en los 4 cuadrados periféricos.

Para la obtención real del recuento de células por cuadrícula, se realizó una sumatoria total en cada una y luego se las promedió entre 4. De esta manera las células contadas sobre 1 mm<sup>2</sup> de superficie corresponderán a 0,1 mm<sup>3</sup> de cultivo, es decir 0,0001 ml. El recuento de células obtenido se llevó a una planilla general de datos (**Anexo A: Tabla de recuento celular**).

A medida que avanza el crecimiento del cultivo durante los días de evaluación, es necesario realizar una dilución de las alícuotas para que la gran cantidad de organismos por cuadrícula no interfiera a la hora de realizar el conteo, generalmente cuando se cuenta un valor mayor a 70 células por cuadrícula se recomienda realizar una dilución. Las mismas luego se toman en cuenta en los cálculos finales.

Por lo tanto, para la obtención final de la densidad algal se aplicó la siguiente fórmula:

$$N_f = \frac{X * 1 \text{ ml}}{0,0001 \text{ ml}} = X * 10000 * FD \quad (1)$$

Siendo:

$N_f$ = Densidad final (cél/ml)

$X$ = Promedio de células

$FD$ = Factor de dilución

Las microalgas presentan un comportamiento de crecimiento similar a los bacterianos (Figura 10) , con 5 fases principales: 1- fase lag o de adaptación: los organismos comienzan a adaptarse al medio y a crecer; 2- fase exponencial: Luego de la adaptación crecen en cantidad y se reproducen; 3- fase de declinación de crecimiento: los pasos previos a la fase 4; 4- fase estacionaria: los organismos llegan a un nivel máximo de reproducción y desarrollo consumiendo todos los nutrientes del medio; 5- fase de muerte: los nutrientes son escasos y los organismos empiezan a morir. (Apuntes de cátedra de Toxicología y Salud Ambiental, 2017)

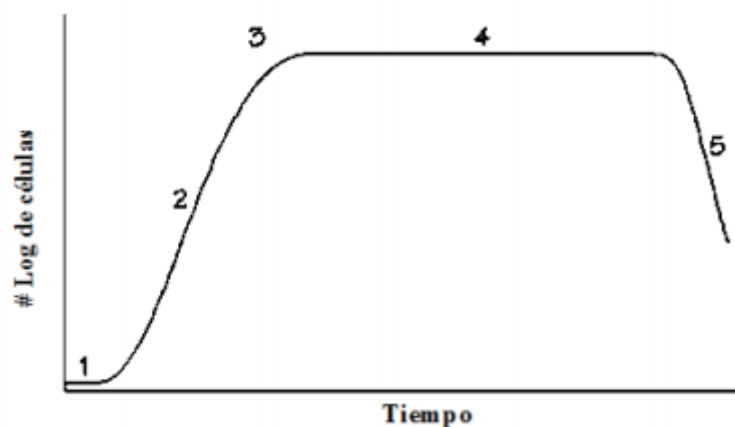


Fig.10. Curva de crecimiento microalgal.

Dependiendo de la especie y la disponibilidad de nutrientes, algunas microalgas, en promedio, pueden duplicar su biomasa en 24 horas.

Con el monitoreo del crecimiento microalgal, se obtuvo una curva y gracias a ello se pudo obtener: la constante de crecimiento en la fase exponencial ( $\mu$ ), la velocidad de crecimiento ( $\nu$ ) y el tiempo de duplicación ( $t$ ).

En la zona de crecimiento exponencial se cumple:

$$v = \mu * N \quad \text{ó} \quad \frac{dN}{dt} = \mu * N$$

Por lo tanto, la velocidad es directamente proporcional a la densidad celular.

Se obtiene una ecuación diferencial de solución  $N = N_0 * e^{\mu * t}$  aplicando logaritmo natural en ambos miembros nos queda  $\ln N = \ln N_0 + \mu * t$  y de esta manera  $\mu$  es la pendiente de la función lineal que describe el crecimiento exponencial microalgal. Despejando de allí se obtiene  $\mu$  y  $t$

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) / t \quad (2) \quad \text{y} \quad t = (\ln N - \ln N_0) / \mu$$

$N$ = Densidad final (cel/ml)  $N_0$ = Densidad inicial (cel/ml)  $\mu$ = pendiente (día<sup>-1</sup>)

$t$ =tiempo total del cultivo (días)  $v$  = velocidad (cel/ml\*día).

Se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) por correlación lineal entre el logaritmo natural de la densidad algal versus tiempo, correspondiendo a la pendiente de la recta, y el tiempo de duplicación ( $T_d$ ), para  $N=2N_0$ , por la siguiente ecuación (Wood et al, 2005)

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \text{ (días)} \quad (3)$$

$T_d$  = Tiempo de duplicación (en días)

## 4.6 Separación de la Biomasa

Luego del crecimiento microalgal, y tras haber esperado 8 días para obtener una biomasa considerable, se procedió a realizar los procesos físicos de sedimentación, sifonado, centrifugado y posterior sonicado. Previo a ellos, se separó y se llevó a cámara de cultivo una pequeña parte del cultivo puro para ser luego utilizado en una de las variantes de los extractos (**4.7 preparación de extractos**).

## Decantación

Es un método de separación de mezclas heterogéneas, el objetivo es separar el material más denso del menos denso, en nuestro caso, por actuación de la gravedad. Se realizaron 2 etapas de decantación, con una duración de 3 días cada una, y un posterior proceso de sifonado en cada decantación. De esta manera, la biomasa fue depositándose en el fondo. La primera decantación se realizó en el recipiente de cultivo y la segunda en envases de gaseosas (Figura 11 derecha) que fueron utilizados como conos de decantación.

## Sifonado

Permite la separación de una mezcla heterogénea utilizando una manguera, en la cual ingresará la parte menos densa de la mezcla. Por lo tanto, luego de cada decantación se procedió a retirar el sobrenadante del cultivo (la parte menos densa) quedando así en el fondo la totalidad de las células microalgales (Figura 11 izquierda y Figura 12).

Se separó una parte del sobrenadante extraído y se lo llevó a 4°C en heladera para luego ser utilizado en una de las variantes de los extractos. **(4.7 preparación de extractos)**



Fig.11. Izquierda: sifonado y 1ra decantación; Centro y derecha: 2da decantación.



Fig. 12. Sifonado de la 2da decantación.

## Centrifugado

Es otro de los métodos separativos de mezclas heterogéneas donde se utiliza una centrífuga que aumenta la velocidad de separación. Esto se realiza dentro de tubos de centrifuga (similares a tubos de ensayo), se los debe colocar de forma enfrentada y con igual volumen (Figura 13) para así evitar derrames y un mal funcionamiento (Figura 14 derecha).

Se centrifugó la biomasa obtenida en las 2 decantaciones luego de 2 lavados sucesivos, con la centrífuga Rolco a una velocidad de 3500 rev/min durante 15 minutos.



Fig. 13. Nivelado de los tubos de centrifuga.



Fig. 14. Izquierda: centrifuga; Derecha: interior de centrifuga con sus tubos opuestos equilibrados.

## Secado

Se realizó en estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta peso constante pasados 2 días. La biomasa colectada, se dejaba en un desecador (Figura 15) y luego se pesaba con una balanza digital Kern ABS.



Fig. 15. Izquierda: biomasa seca post estufa; Derecha: biomasa en desecador previa a ser pesada.

#### **4.7 Preparación de extractos**

En esta etapa se realizó la preparación de los extractos que se usarían en los ensayos de bioestimulación (Figura 17 derecha) que luego serían utilizados, evaluando su eficacia sobre las semillas, por medio del poder germinativo.

Se realizó la extracción con etanol al 2%*m/V*, con y sin ruptura celular a partir de la biomasa seca obtenida en el apartado 4.6. Para la ruptura celular se utilizó un sonicador ultrasónico.

Los extractos que se prepararon variaron según: ruptura (sonicado), sin ruptura (sin sonicar); % de concentración; sobrenadante, cultivo y efluente de matadero por lo que se detalla de la siguiente manera (figura 18 y 19):

- 1. T00 Control, 0 %** de extracto (10 ml de agua destilada).
- 2. T01 Concentración 1%** (0,1 ml de extracto sin ruptura celular y 9,9 ml de agua destilada).
- 3. T02 Concentración 10%** (1 ml de extracto sin ruptura celular y 9 ml de agua destilada).
- 4. T03 Concentración 50%** (5 ml de extracto sin ruptura celular 5 ml de agua destilada).
- 5. T04 Concentración 100 %** (10 ml de extracto con ruptura celular).
- 6. T05 Concentración 1%** (0,1 ml de extracto con ruptura celular y 9.9 ml de agua destilada).
- 7. T06 Concentración 10%** (1 ml de extracto con ruptura celular y 9 ml de agua destilada).
- 8. T07 Concentración 50%** (5 ml de extracto con ruptura celular 5 ml de agua destilada).
- 9. T08 Concentración 100 %** (10 ml de extracto con ruptura celular).
- 10. T09 Sobrenadante del cultivo** (10 ml).
- 11. T10 Cultivo en el efluente** (10 ml).
- 12. T11 Cultivo en el efluente con ruptura** (10 ml).

### 13. T12 Efluente 100 % (10 ml).

#### Sonicado

Este proceso se utilizó para realizar la ruptura celular de *Scenedesmus brevispina* y de esta manera lograr que estén disponibles todos los metabolitos celulares libres en los extractos, entre ellos la fitohormona giberelina utilizada para romper la dormancia de las semillas de *Pappostipa humilis* y analizar el poder germinativo en pasos posteriores.

La sonicación a comparación de otros métodos de lisis y extracción de metabolitos en usos biotecnológicos es una herramienta muy eficiente y fiable ya que permite un control completo sobre los parámetros de sonicación. Esto asegura una alta selectividad en la liberación de materiales y en la pureza del producto. (Balasundaram *et al.* 2009).

La ruptura celular se hizo con un sonicador JY88-IIN Ultrasoniccellcrusher con un tiempo de 20 minutos (fig.16 izquierda), una potencia de 200 W y pulsos de 20 s, el tiempo estimado se determinó gracias a los análisis realizados con distintas cepas microalgales (Matías Narez, puesta a punto de la técnica, comunicación personal), destacando la dureza y rigidez de la pared celular de *S. brevispina* por ser una clorofita en comparación con otras cepas, fue la que mayor tiempo de exposición tuvo al sonicado para evidenciar la ruptura celular.

La temperatura durante el proceso, es uno de los parámetros importantes que se deben tener en cuenta ya que una mínima modificación puede alterar los metabolitos celulares liberados, por lo que puede ser monitoreada por un sensor de temperatura integrado y se puede controlar fácilmente mediante enfriamiento (baño de hielo o células de flujo con chaquetas de enfriamiento) o mediante sonicación en modo pulsado. Durante la sonicación de pulsos, ciclos de ráfagas cortas de sonicación de 1-15 segundos de duración permiten la disipación de calor y la refrigeración durante los períodos intermitentes más largos.

En nuestro caso, se decidió monitorearla con el agregado de hielo (fig.16 centro) durante el proceso de sonicado y pulsos en un lapso de 20 s en tubos

de ensayo que contenían 30 ml de extracto con ruptura, a partir del mismo se realizaron las diluciones que se detallaron anteriormente.

El efecto del sonicado se observó claramente por la diferencia de intensidad del color (Figura 17 izquierda). Se realizó el sonicado del efluente en las mismas condiciones.

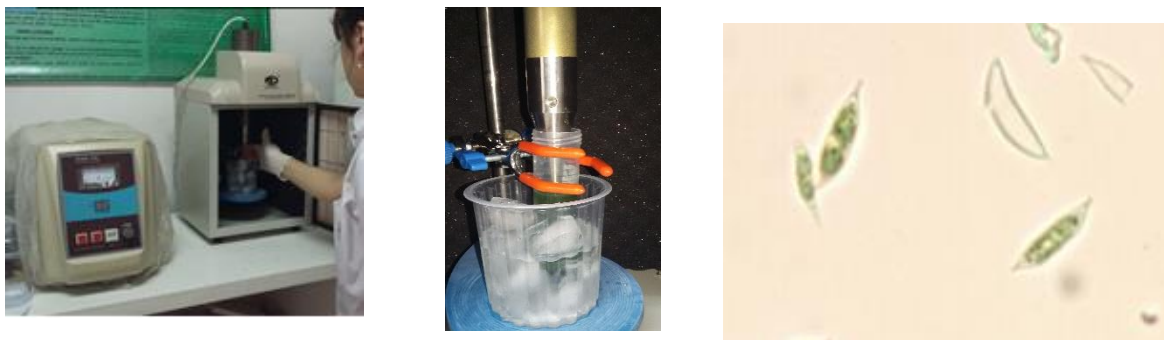


Fig. 16. Izquierda: sonicado de células *S. brevispina*; Centro: sonicado con baño de hielo; Derecha: células de *S. brevispina* vistas al microscopio luego del sonicado.

Cabe destacar que todas las suspensiones realizadas fueron conservadas a 4°C en heladera y tapadas en papel aluminio por 24 hs para luego realizar todos los extractos con sus respectivas diluciones.

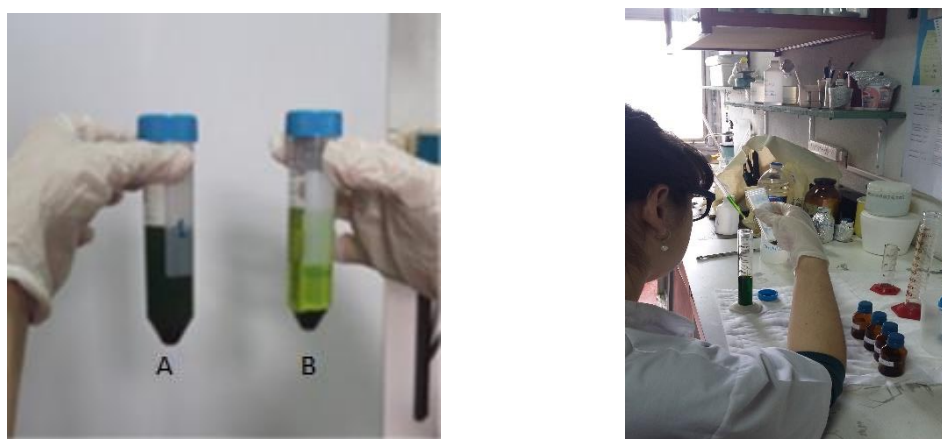


Fig.17. Izquierda: Extractos etanólicos(A) sonicado, (B) sin sonicar; Derecha: preparación de extractos.



Fig. 18. Extractos preparados según el listado.



Fig. 19. Observación de la variación de concentración de los extractos apreciada por la variación de color.

## 4.8 Caracterización y acondicionamiento de semillas

**Clasificación taxonómica:** (Zuloaga *et al*, 2012)

Moncotiledoneae

**Familia:** Poaceae

**Subfamilia:** Pooideae

**Tribu:** Stipeae

**Género:** *Pappostipa*

**Especie:** *Pappostipa humilis* (Cav.) Romasch. var. *humilis*.

### Características morfológicas de la semilla:

En este trabajo el término “semilla” comprendería al fruto completo, es decir, el cariósido con su arista.

El fruto completo está formado por 3 zonas que pueden observarse a simple vista: Arista, columna y cariósipide. La arista se extiende desde la zona más alta siendo geniculada y cobriza de 3 a 6 cm de largo. A partir de ella y hacia abajo se encuentra la columna de 0,7 a 2cm de largo, pilosa, con pelos de 5 a 10 mm de largo que contiene una zona glabra (desprovista de pelos o con pelos más cortos) de 2 a 3 mm de largo. Al finalizar, tenemos el cariósipide fusiforme de 6 a 7 mm de largo donde su parte basal finaliza en un ápice agudo escabroso (lleno de asperezas y tricomas cortos y rígidos apreciables al tacto, densamente viloso (piloso) (Figuras 20 y 21).

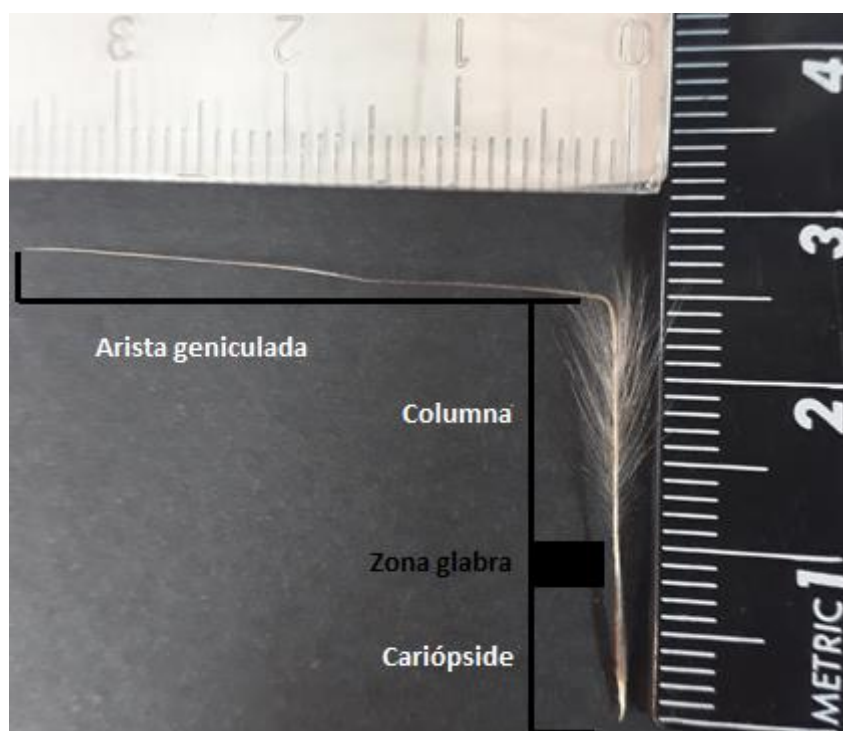


Fig. 20. Observación de las 3 zonas distintivas de la semilla en 1x

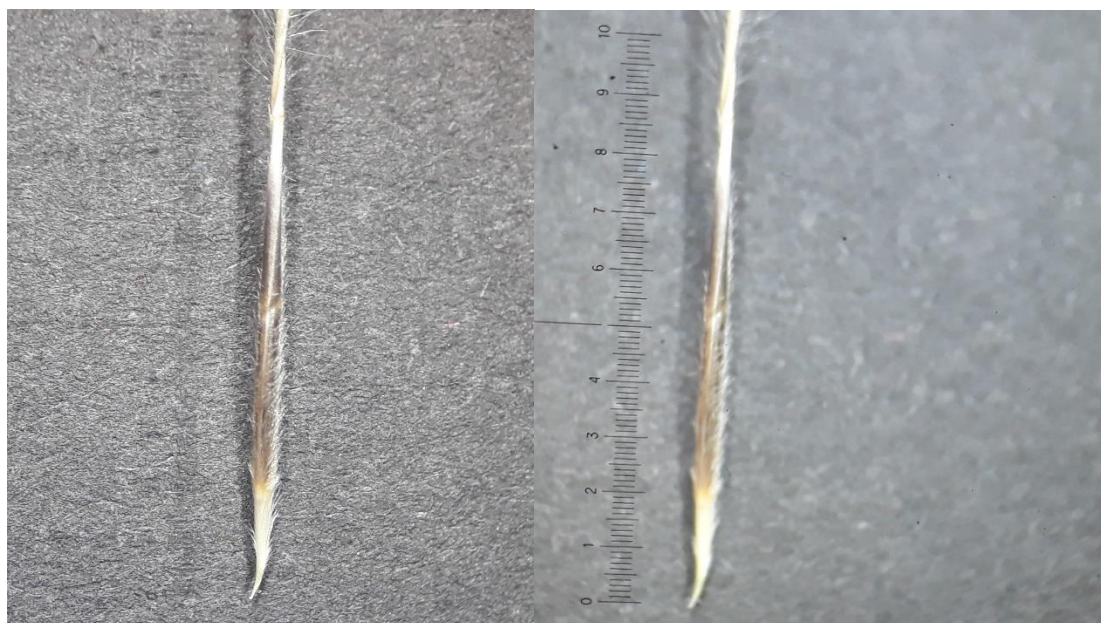


Fig. 21. Observación en lupa 8x del cariósipide. Izquierda: Detalle de los tricomas y zona densamente vilosa con ápice agudo y escabroso. Derecha: Detalla de la medida del cariósipide de 6 a 7 mm aproximadamente.

### **Acondicionamiento de la semilla**

Del total de semillas facilitadas por el Banco de germoplasma de la Estación Experimental del INTA Trelew, se utilizaron las que habían sido colectadas en el año 2016 y las cuales tenían un poder germinativo bajo (45%), valor obtenido por análisis previos en la Estación Experimental, lo que quiere decir que, de un total de 100 semillas en condiciones normales de temperatura, disponibilidad de humedad y fotoperíodo, germinaron 45. Es necesario destacar que este valor y el peso de la semilla puede ir disminuyendo a medida que pasan los años, por condiciones naturales de envejecimiento celular, por lo que a la hora de realizar análisis comparativos es necesario realizarlo nuevamente.

Al total de semillas se las separó en grupos de 100 para medir su peso llevando una extrapolación a 1000. (ISTA, 2011).

Se eliminó la arista de las semillas y luego se seleccionaron las que se encontraban enteras y llenas. Posteriormente fueron esterilizadas sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10

minutos (Figura 22) y luego enjuagadas dos veces con agua destilada (ISTA, 2011).



Fig. 22. A la izquierda esterilización con hipoclorito de sodio al 1%, a la derecha enjuague y secado en papel tissue.

#### 4.9 Ensayos de bioestimulación

Se evaluó la germinación de las semillas durante 20 días por medio del uso de los distintos extractos preparados (**apartado 4.7**).

Los ensayos se realizaron por triplicado en cajas de Petri, ubicando 16 semillas en cada una en una disposición circular para una mejor observación y agregado de gotas de cada extracto. En total se utilizaron 624 semillas y 39 cajas de Petri.

Todo el material utilizado (cajas de Petri, pinzas, mesadas, bandejas) fue debidamente esterilizado con una solución de alcohol al 70% para evitar posible contaminación.

Las semillas fueron dispuestas sobre un papel no tóxico (servilletas de papel marca Sussex) en cada caja de Petri de plástico y distribuidas en toda su superficie como muestra la Figura 22 (izquierda) y para su transporte se utilizaron bandejas plásticas (Figura 22 derecha) (Rao *et al*, 2007).



Fig.23. Izquierda: disposición circular de semillas en caja de Petri; Derecha: bandejas con cajas de Petri en cámara de cultivo.

Los ensayos de germinación se realizaron durante 20 días con la utilización de una cámara de cultivo con condiciones controladas: fotoperíodo 12:12, temperatura de  $11 \pm 1^\circ\text{C}$  en la oscuridad y  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  cuando la iluminación era de  $3,43 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (valor promedio de la cámara).

Se utilizó una planilla (**Anexo B: Planilla de seguimiento de germinación**) para registrar la cantidad de semillas germinadas por placa de Petri y cualquier otra observación en las mismas (presencia de hongos, color, rotura, etc.) cada 24 horas. Al iniciar el día se retiraba de la cámara de cultivo las bandejas, se registraba lo observado y luego se procedía a aplicar los extractos y mantener la humedad de las cajas de Petri. Las semillas con presencia de hongos eran retiradas para evitar la propagación y contaminación de las demás, las mismas seguían el análisis de germinación en placas de Petri aparte. Por otro lado, a medida que avanzaba el ensayo, las semillas germinadas y ya registradas eran separadas de las placas.

Se consideró semilla germinada aquella que tuviera una longitud de raíz de 2 mm. (Figura 24 A y B)

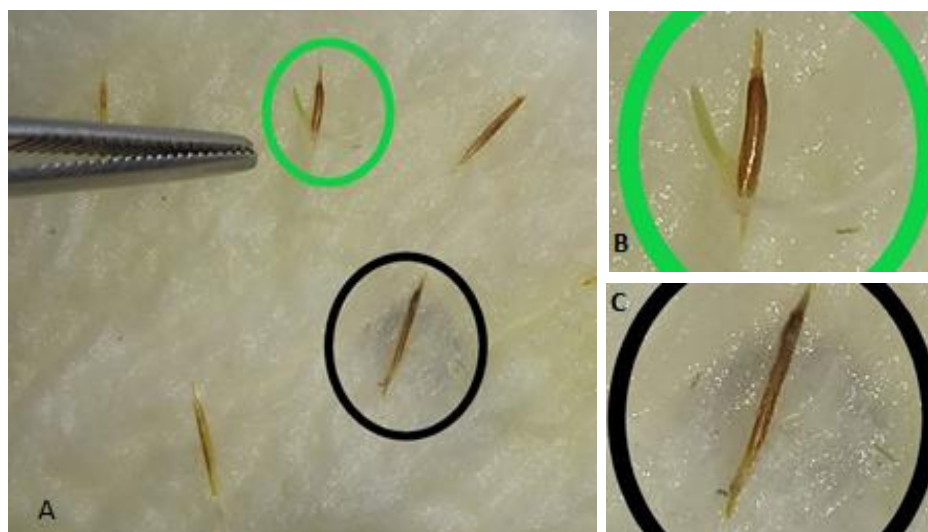


Fig. 24. **A-** La circunferencia verde engloba la semilla germinada y la circunferencia negra una semilla con hongo. **B-** Se observa la hoja y la raíz mayor a 2mm. **C-** Semilla con hongo.

Se calculó el Poder Germinativo (PG) y la Energía de Germinación (EG). El Poder Germinativo, una estimación de la viabilidad de una población de semillas, se calculó según:

$$PG = \frac{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de semillas que no fueron atacadas por hongos}} \cdot 100 \quad (4)$$

La Energía de Germinación, una medida de la velocidad de germinación, y por lo tanto una medida del vigor de las plántulas producidas, se calculó de acuerdo con Hernández- Herrera *et al* (2013), según la expresión

$$EG = \frac{\text{N}^\circ \text{ de semillas germinadas al 7}^\circ \text{ día}}{\text{N}^\circ \text{ total de semillas que no fueron atacadas por hongos}} \cdot 100 \quad (5)$$

Todas las semillas que fueron germinadas fueron utilizadas para realizar plantines (fig.25) para el vivero de la Experimental de INTA de Trelew que luego son utilizados para revegetar zonas degradadas de la provincia del Chubut por explotación de canteras y explotación petrolera.



Fig.25. Bandejas de propagación de *P.humilis*.

#### 4.10 Análisis Estadístico.

Con el programa Infostat Versión 12.0.0.0. los datos obtenidos de las pruebas se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA-  $p= 0,05$ ). y a una comparación de medias de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p= 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Crecimiento y Densidad Celular

La Fig. 26 muestra la curva de crecimiento *S.brevispina* en el efluente de matadero. La densidad celular se alcanzó al octavo día según la ecuación (1) en un valor de  $(3,1 \pm 0,5) 10^6$  cél/mL. La Figura 27 presenta el logaritmo natural de las densidades celulares en función del tiempo. La linealidad en esta última gráfica nos indica que el crecimiento se mantuvo exponencial en todo el ensayo. La constante de velocidad específica de crecimiento  $\mu$  dada por la ecuación (2) fue de  $0,433 \text{ d}^{-1}$  y el tiempo de duplicación dado por la ecuación (3), fue  $T_d = 1,60 \text{ d}$ . La biomasa obtenida fue sometida a ultrasonido. El tiempo necesario para la ruptura de la pared celular fue superior al estimado por Stirk *et al.* (2002) ya que se necesitaron 20 min, en lugar de 2 min, con la mayor potencia del equipo (200 W), para lograrlo. La intensidad del tratamiento se debe a que *S. brevispina* tiene una pared celular muy resistente, compuesta por múltiples capas de celulosa y hemicelulosa en la parte interna y esporopolenina y politerpenos en la parte externa (Passos *et al.*, 2014). La coloración de los extractos etanólicos obtenidos fue más intensa en el caso de las células sonicadas demostrando también la efectividad del sonicado.

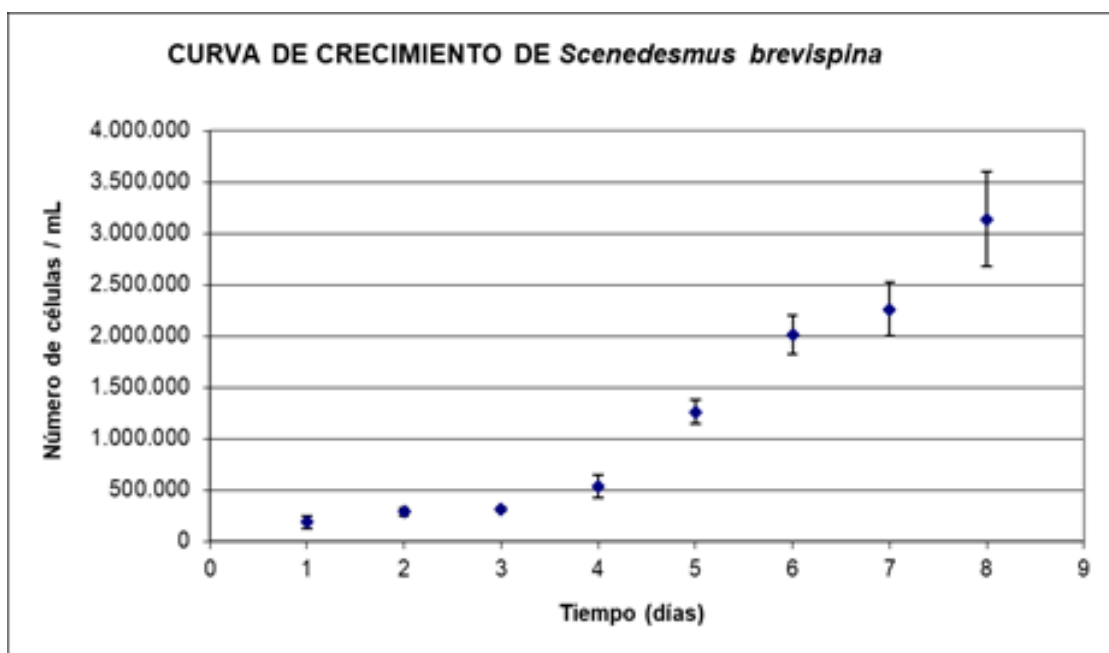


Fig. 26. Crecimiento de *S. brevispina* en efluente de matadero.

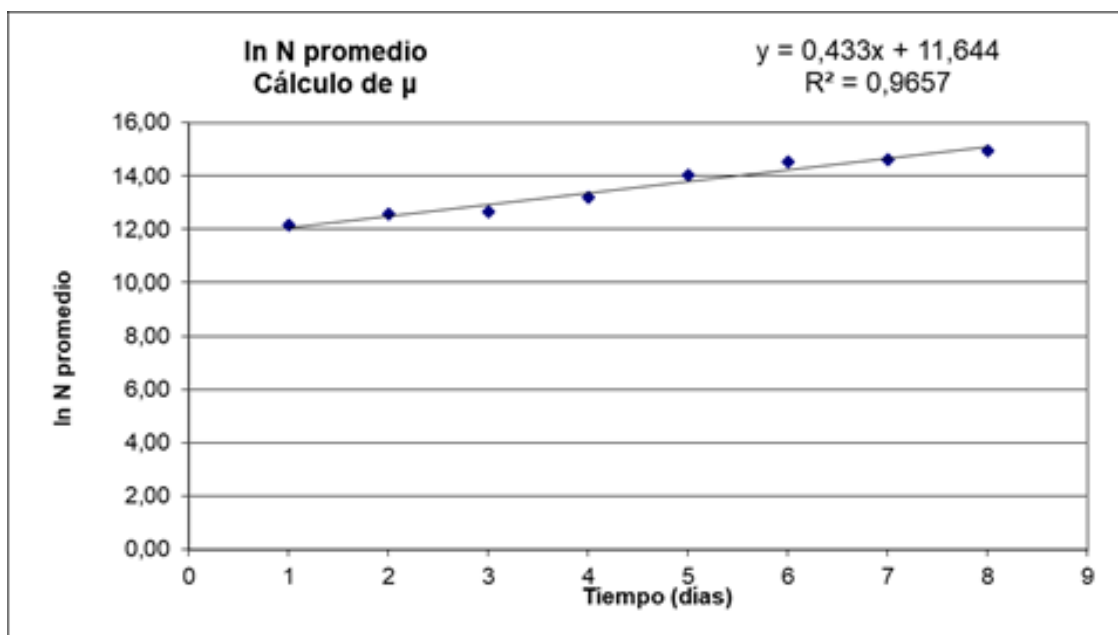


Fig.27. Cálculo de parámetros de crecimiento de *S.brevispina*.

### Resultados y observaciones de los tratamientos

Las semillas llenas y sin aristas presentaron un peso de  $969 \pm 50$  mg por cada 1000 semillas.

La Tabla 1 presenta el número de semillas germinadas en cada tratamiento y las semillas atacadas con hongos. Se consideró semilla germinada cuando la radícula superó los 2 mm de longitud. El ensayo duró 20 días.

Se calculó el Porcentaje de Germinación (PG) según ecuación (4) y la Energía de Germinación (EG), según la ecuación (5). El Porcentaje de Germinación, una estimación de la viabilidad de una población de semillas.

**Tabla 1: Resultados obtenidos en el ensayo de germinación.**

Referencias: S/R: sin ruptura, C/R: con ruptura

Ensayos	Descripción	Semillas germinadas	Semillas con Hongos	Poder Germinativo (%)	Energía de Germinación (%)
T0A	TESTIGO	6	3	46,15	15,38
T0B	TESTIGO	5	5	45,45	27,27
T0C	TESTIGO	4	2	28,57	7,14
T1A	1% S/R	5	0	31,25	6,25
T1B	1% S/R	8	0	50,00	6,25
T1C	1% S/R	6	1	40,00	13,33
T2A	10% S/R	5	2	35,71	0,00
T2B	10% S/R	3	1	20,00	0,00
T2C	10% S/R	0	1	0	0,00
T3A	50% S/R	0	0	0	0,00
T3B	50% S/R	0	0	0	0,00
T3C	50% S/R	0	1	0	0,00
T4A	100% S/R	0	0	0	0,00
T4B	100% S/R	0	0	0	0,00
T4C	100% S/R	0	0	0	0,00
T5A	1% C/R	5	0	31,25	0,00
T5B	1% C/R	8	2	57,14	35,71
T5C	1% C/R	4	0	25,00	18,75
T6A	10% C/R	6	0	37,50	0,00
T6B	10% C/R	5	10	83,33	0,00
T6C	10% C/R	3	2	21,43	14,29
T7A	50% C/R	2	0	12,50	0,00
T7B	50% C/R	1	1	6,67	0,00
T7C	50% C/R	0	2	0	0
T8A	100% C/R	0	0	0	0
T8B	100% C/R	0	0	0	0
T8C	100% C/R	0	0	0	0
T9A	SOBRENAD	3	0	18,75	6,25
T9B	SOBRENAD	2	2	14,29	7,14
T9C	SOBRENAD	3	1	20,00	6,67
T10A	CULT S/R	5	1	33,33	6,67
T10B	CULT S/R	10	1	66,67	26,67
T10C	CULT S/R	7	1	46,67	26,67
T11A	CULT C/R	3	3	23,08	23,08

Ensayos	Descripción	Semillas germinadas	Semillas con Hongos	Poder Germinativo	Energía de Germinación
T11B	CULT C/R	3	1	20,00	20,00
T11C	CULT C/R	9	0	56,25	25,00
T12A	EFLUENTE	2	2	14,29	7,14
T12B	EFLUENTE	4	2	28,57	14,29
T12C	EFLUENTE	3	3	23,08	23,08

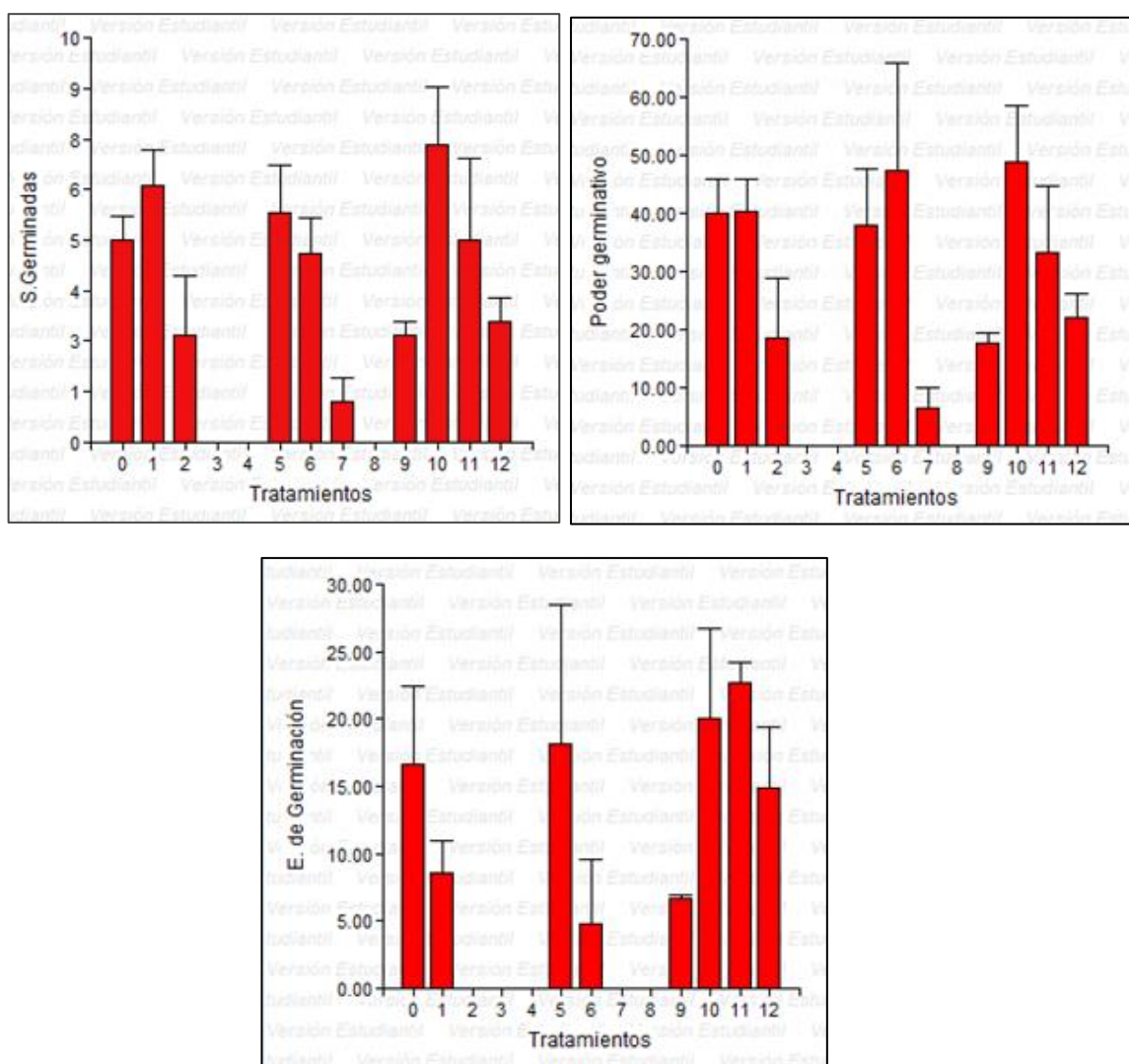


Fig. 28. Gráficos de barras (el segmento superior indica la desviación estándar): Semillas Germinadas, Poder Germinativo, y Energía de Germinación vs Tratamientos.

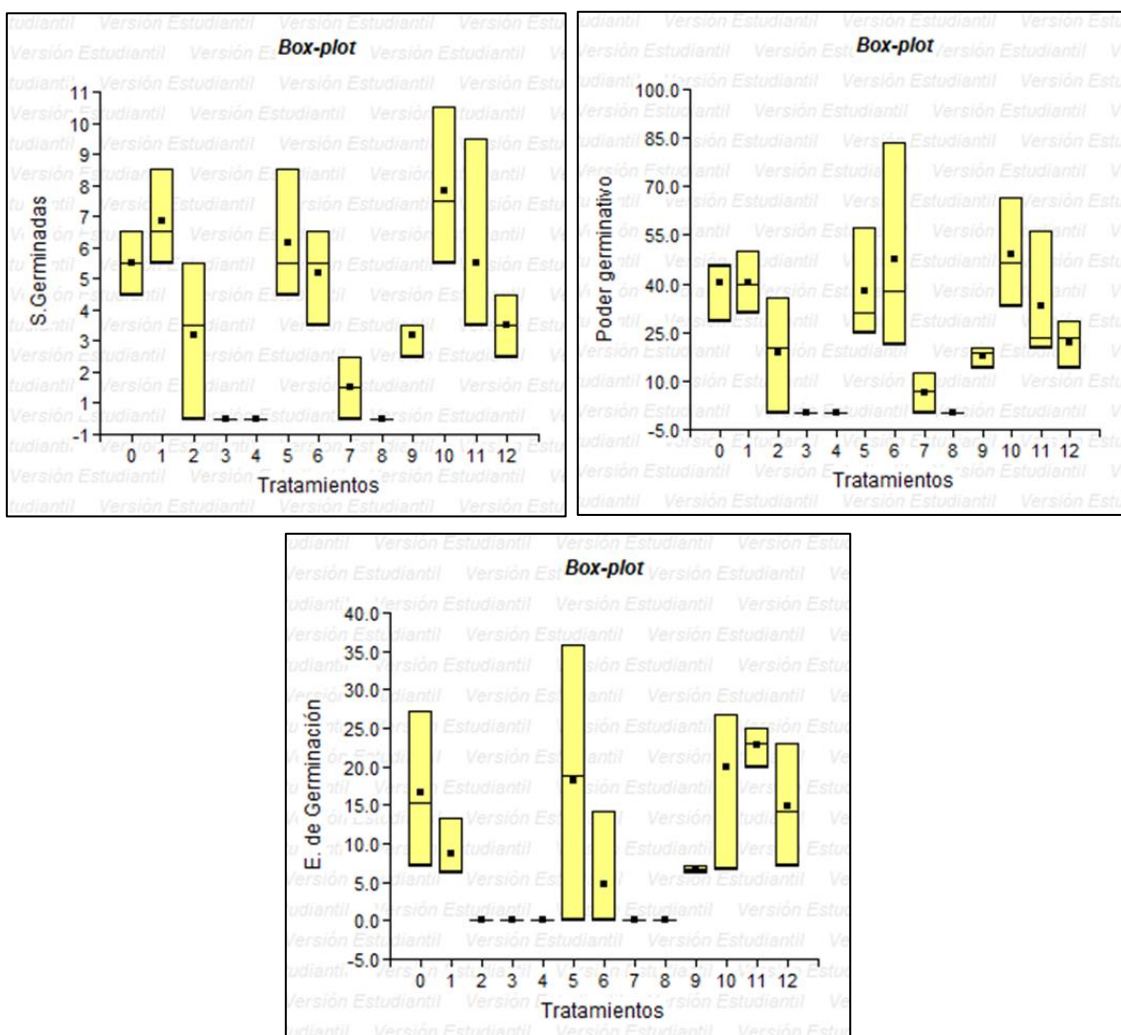


Fig. 29. Gráficos Box-plot (El punto dentro de cada rectángulo corresponde al promedio) de Semillas germinadas, Poder Germinativo y Energía de Germinación.

Las figuras 30, 31 y 32 muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias de acuerdo a la prueba de Tukey ( $p=0,05$ ).

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
S.Germinadas	39	0.76	0.65	50.61

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	232.67	12	19.39	6.81	<0.0001
Tratamientos	232.67	12	19.39	6.81	<0.0001
Error	74.00	26	2.85		
Total	306.67	38			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.00579

Error: 2.8462 gl: 26

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
3	0.00	3	0.97	A
4	0.00	3	0.97	A
8	0.00	3	0.97	A
7	1.00	3	0.97	A B
2	2.67	3	0.97	A B C
9	2.67	3	0.97	A B C
12	3.00	3	0.97	A B C
6	4.67	3	0.97	A B C
11	5.00	3	0.97	A B C
0	5.00	3	0.97	A B C
5	5.67	3	0.97	B C
1	6.33	3	0.97	C
10	7.33	3	0.97	C

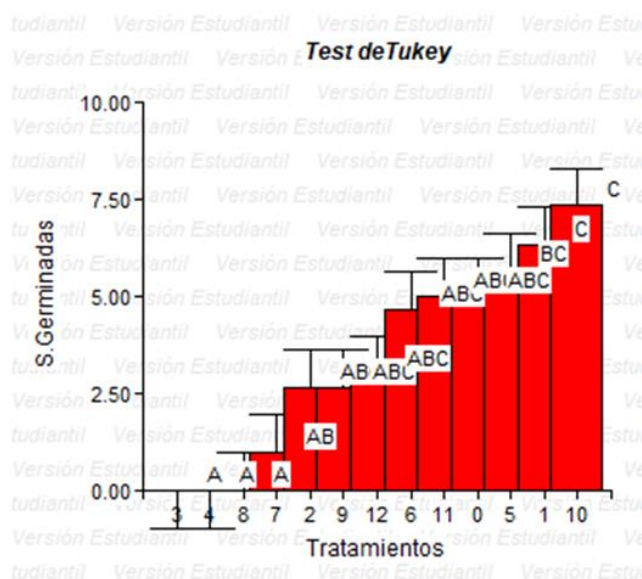


Fig. 30. ANOVA y Test de Tukey en Semillas Germinadas vs Tratamientos.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Poder germinativo	39	0.70	0.56	59.04

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12241.26	12	1020.11	5.07	0.0003
Tratamientos	12241.26	12	1020.11	5.07	0.0003
Error	5230.80	26	201.18		
Total	17472.06	38			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=42.08633

Error: 201.1845 gl: 26

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
8	0.00	3	8.19	A
3	0.00	3	8.19	A
4	0.00	3	8.19	A
7	6.39	3	8.19	A B
9	17.68	3	8.19	A B C
2	18.57	3	8.19	A B C
12	21.98	3	8.19	A B C
11	33.11	3	8.19	A B C
5	37.80	3	8.19	A B C
0	40.06	3	8.19	A B C
1	40.42	3	8.19	A B C
6	47.42	3	8.19	B C
10	48.89	3	8.19	C

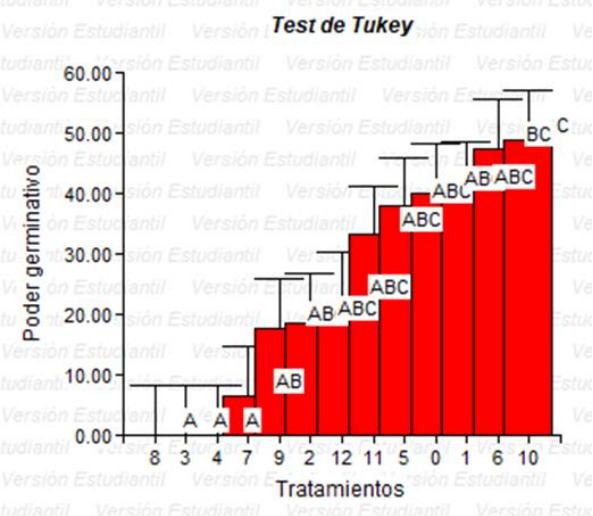


Fig.31. ANOVA y Test de Tukey en Poder Germinativo vs Tratamientos.

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
E. de Germinación	39	0.66	0.50	85.51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2732.78	12	227.73	4.17	0.0011
Tratamientos	2732.78	12	227.73	4.17	0.0011
Error	1419.80	26	54.61		
Total	4152.57	38			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=21.92654

Error: 54.6075 gl: 26

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
2	0.00	3	4.27	A
3	0.00	3	4.27	A
7	0.00	3	4.27	A
8	0.00	3	4.27	A
4	0.00	3	4.27	A
6	4.76	3	4.27	B
9	6.69	3	4.27	B
1	8.61	3	4.27	B
12	14.84	3	4.27	B
0	16.60	3	4.27	B
5	18.15	3	4.27	B
10	20.00	3	4.27	B
11	22.69	3	4.27	B

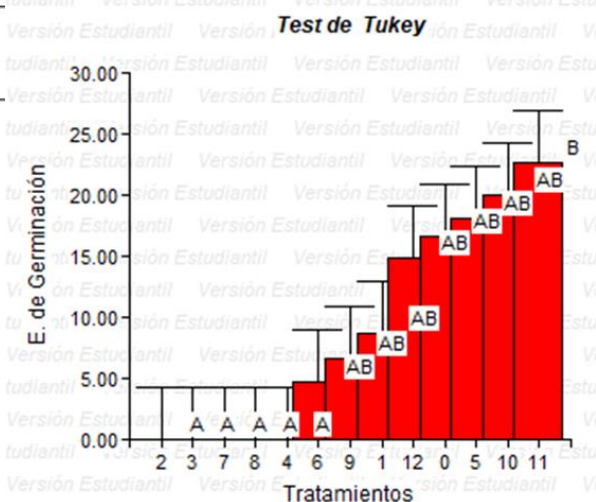


Fig.32. ANOVA y Test de Tukey en Energía de Germinación vs Tratamientos.

En general se observó una estimulación de la germinación en los tratamientos con cultivos de microalga con y sin sonicar, pero una inhibición en la germinación en los ensayos con extractos etanólicos. En particular el Tratamiento 10 (cultivo sin sonicar) y el Tratamiento 11 (Cultivo con ruptura) son los que presentan mayor Poder germinativo y Energía de germinación, 48,89 % y 22,69 %, respectivamente. El Test de Tukey los ubica únicamente en el subgrupo con valores superiores del análisis respectivo (subgrupo C). Los Tratamientos 5 y 6 (1 y 10 % con rotura celular) son los tratamientos con extracto etanólico que dieron mejores resultados: 37,80 y 47,42 % de Poder germinativo, respectivamente. Hubo un aumento en la inhibición en la germinación cuando el porcentaje de etanol se incrementaba. En los tratamientos 3, 4 y 8, ninguna semilla germinó.

Sólo los Tratamientos 6 y 10 superaron el valor de 45 % que nos dio inicialmente INTA para este lote.

Se investigó de forma bibliográfica casos de germinación estudiados en especies similares a *Pappostipa humilis* para comparar su comportamiento en cuanto a la ruptura de dormancia y comienzo de germinación.

La germinación es un proceso complejo durante el cual la semilla debe recuperarse rápidamente del secado de la maduración, reanudar una

intensidad sostenida del metabolismo, completar los eventos celulares esenciales para permitir que emerja el embrión y prepararse para el posterior crecimiento de las plántulas. Los aumentos o modificaciones de las hormonas, especialmente giberelina, juegan un papel importante en el logro de la finalización de la germinación, al menos en las semillas intactas. Una restricción sobre la finalización de la germinación en las semillas de algunas especies es impuesta por las estructuras circundantes, por ejemplo, el endosperma, y por lo tanto existe un requerimiento ya sea para que se debilite enzimáticamente para permitir que emerja la radícula, o para que se genere suficiente fuerza dentro del eje del embrión para atravesarlo físicamente, o para ambos. (Nonogaki *et al*, 2010). Varios de los tejidos que comprenden una semilla van a contribuir a su nivel de latencia final. (Graeber *et al*, 2012).

Fulbright *et al* (1983) estudiaron los requisitos de germinación de Neddlegrass verde (*Nassella viridula* (Trin.) Barkworth) debido a su potencial para el uso en la revegetación de tierras perturbadas, examinando los efectos de los tratamientos de temperatura, luz, fisiológicos y mecánicos sobre la germinación de semillas provenientes de cuatro lugares diferentes de South Dakota (EEUU) para determinar los requisitos de máxima germinación y las posibles causas de latencia. Las temperaturas óptimas para la germinación fueron 20 °C (constante, en oscuridad) y 20-15 ° C (16 h-8 h de alternancia luz-oscuridad). La germinación fue máxima en la oscuridad constante. La germinación más grande de la fuente más inactiva ocurrió cuando las semillas se trataron con ácido giberélico y la lemma y la palea se cortaron con una cuchilla de afeitar. Los resultados indicaron que la latencia de las semillas se asoció con una deficiencia de giberelinas endógenas y con las restricciones mecánicas y de permeabilidad impuestas por la lemma y la palea.

Gasque y García Fayos (2003). estudiaron los rasgos del ciclo de vida relacionados con la germinación de semillas de *Stipa tenacissima* L., una especie clave en ambientes semiáridos de las áreas del Mediterráneo occidental. Analizaron la longevidad de las semillas, así como el tipo de latencia de las semillas y el papel de las cubiertas de semillas recolectadas de diferentes poblaciones en el sureste de España. Encontraron que hubo una variación significativa en la germinación de semillas entre individuos,

poblaciones y años. La lemma y la palea fueron el factor principal que controlaba estas diferencias ya que su eliminación promovió una germinación más alta y más rápida y eliminó las diferencias en los parámetros de germinación entre las poblaciones. Sin embargo, el control de la latencia por la lemma y la palea, fue independiente de su peso, lo que sugiere que su naturaleza química juega un papel más importante que el tamaño en el control de la germinación de la semilla. Los tratamientos mecánicos de escarificación (a través de la abrasión con arena) no afectaron la germinación de la semilla.

En Asia Central, donde las especies de *Stipa* están muy extendidas, Ronnenberg *et al* (2008) estudiaron especies de Mongolia y observaron que su latencia era más pronunciada en las semillas de procedencias más húmedas, lo que implica considerar estos aspectos al realizar ensayos de germinación.

La germinación de semillas es una transición importante del ciclo de vida porque determina la subsiguiente supervivencia de las plantas y el éxito reproductivo. Para detectar condiciones espacio-temporales óptimas para la germinación, las semillas actúan como sensores ambientales sofisticados que integran información, como la temperatura ambiente. Graeber *et al* (2014) demostraron que el gen denominado DELAY OF GERMINATION 1 (DOG1) causa alteraciones dependientes de la temperatura en el metabolismo del ácido giberélico (AG) de la semilla. Estas alteraciones en el metabolismo hormonal se deben a la expresión diferencial dependiente de la temperatura de los genes que codifican las enzimas clave de la ruta biosintética de AG. Estos efectos de DOG1 conducen a un control dependiente de la temperatura del debilitamiento del endosperma y determinan la temperatura óptima para la germinación.

Estos estudios y otros han demostrado que diversos factores endógenos y ambientales regulan el equilibrio entre la latencia y la germinación, como la luz, la temperatura, el estado del agua y las bacterias en el suelo, y fitohormonas como ABA (ácido abscísico) y AG (ácido giberélico) (Shu *et al*, 2015).

La germinación de las semillas comienza con la imbibición y termina con la aparición de la radícula (Han y Yang, 2015). Implica la transición de un estado de tolerancia a la sequía y a las temperaturas extremas, a un estado vulnerable, la plántula (Gasque y García Fayos, 2003).

Las sustancias promotoras del crecimiento y los nutrientes presentes en las microalgas sirven entonces a la joven planta en esta etapa tan decisiva.

## 6 CONCLUSIÓN.

*Scenedesmus brevispina* creció satisfactoriamente en efluente de matadero. En general se observó una estimulación de la germinación en los tratamientos con cultivos de microalga, con y sin sonicar, pero una inhibición en los ensayos con extractos etanólicos. En particular el Tratamiento 10 (cultivo sin sonicar) y el Tratamiento 11 (Cultivo con ruptura) son los que presentan mayor Poder germinativo y Energía de germinación, 48,89 % y 22,69 %, respectivamente.

De realizarse pruebas posteriores se cree que sería necesario introducir pretratamientos a las semillas tales como enfriamiento, escarificación ácida y/o mecánica, para poder eliminar estos factores que podrían influenciar de forma directa en la semilla y por ende enmascarando la actuación bioestimuladora de la microalga. También se plantea la idea de utilizar el cultivo sin sonicar y con ruptura, descartando los extractos etanólicos ya que quedó evidenciado que a mayor concentración produjo una mayor inhibición de proliferación de hongos, lo cual es favorable pero no así en el aumento de la germinación. A fin de estimular el crecimiento y aumentar el poder germinativo de esta especie vegetal nativa que contribuye a restituir la estructura y cobertura vegetal de áreas degradadas en la zona patagónica.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Apuntes de Cátedra de Toxicología y Salud Ambiental. 2017 UNPSJB. Sede Trelew.

Balasundaram, B. Harrison, S; Bracewell, DG (2009): Avances en estrategias de liberación de productos e impacto en el diseño de bioprocesos. Tendencias en Biotecnología 27/8, 477- 485.

Becker E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. Biotechnology Advances, 25, 207-210.

Beider A. (2012). Viverización de Especies Nativas de Zonas Áridas Experimentia 2 Revista de Transferencia Científica IADIZA-CONICET-UGAP (Unidad de Gestión Ambiental Payunia) Fundación CRICYT, Mendoza - ISSN 1853-905X.

Clesceri LS (WPCF), Greenberg AE (APHA) & Rhodes Trussell R (AWWA). 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17 edición. Ediciones Díaz de Santos, S.A. 1992. Juan Bravo, 3- A. 28006 Madrid (España).

Decreto Reglamentario 1540/16 de la Ley XI N° 35 de Código Ambiental de la Provincia del Chubut.

Faheed FA, Abd-El Fattah Z. 2008. Effect of *Chlorella vulgaris* as Bio-fertilizer on Growth Parameters and Metabolic Aspects of Lettuce. Plant. J. Agri. Soc. Sci.,4: 165-169.

Fulbright, T.E., Redente, E.F. & Wilson, M.A. (1983). Germination Requirements of Green Needlegrass (*Stipa viridula* Trin.) *Journal of Range Management*, 36(3), 390-394.

Gasque, M. & García-Fayos, P. (2003) Seed dormancy and longevity in *Stipa tenacissima* L. (Poaceae). *Plant Ecology*, 168(2), 279-290.

Graeber, K., Nakabayashi, K. Miatton, E., Leubner-Metzger, G. & Soppe, W.J.J. (2012) Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell and Environment*, 35, 1769–1786.

Graeber, K., Linkies, A., Steinbrecher, T., Mummenhoff, K., Tarkowská, D., Turečková, V., Ignatz, M., Sperber, K., Voegele, A., de Jong, H., Urbanová, T., Strnad, M., & Leubner-Metzger, G. (2014). DELAY OF GERMINATION 1 mediates a conserved coat-dormancy mechanism for the temperature- and gibberellin-dependent control of seed germination. *PNAS*, 111(34), E3571-E3580. doi.org/10.1073/pnas.1403851111.

Griffiths O, Serra J, Escobar JM & Nakamatsu V. (1983). Implantación de especies arbustivas autóctonas e introducidas con valor forrajero y protector de suelo, en el área del Monte Patagónico. IDIA, Suplemento N° 36. Séptima Reunión Nacional para el estudio de las regiones Áridas y Semiáridas, pp. 255-259.

Han, C. & Yang, P. (2015) Studies on the molecular mechanisms of seed germination, *Proteómica*, 15(10), 1671- 1679. DOI: 10.1002 / pmic.201400375.

Hernández-Pérez A, Labbé JI. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios Revista de Biología Marina y Oceanografía. Vol. 49, N°2: 157-173

International Seed Testing Association (ISTA). (2011). *International rules for seed testing*. Bassersdorf, Switzerland.

Molnar Z & Ördög V. (2005). "Microalgal and cyanobacterial extracts in the tissue culture of higher plants (pea, tobacco, beet)." *Acta Biologica Szegediensis*, 49(1-2), 39-40.

Nonogaki, H., Bassel, G.W. & Bewley, J.D. Germination. Still a mystery. (2010) *Plant Science*, 179(6), 574-581. Doi: 10.1016/j.plantsci.2010.02.010.

Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H. & Ferrer, I. (2014). Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. *Bioresource Technology*, 172, 403–412.

Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Novell, D. & Larinde M. (2007). Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioersivity International, Roma, Italia.

Rodríguez Araujo ME & Pérez DR. (2015) Estado del conocimiento sobre germinación y conservación de especies de zonas áridas de Patagonia. IV Congreso Iberoamericano y del Caribe de restauración ecológica Buenos Aires, Argentina 12-16 de abril 2015.

Ronnenberg, K., Wesche, K. & Hensen, I. (2008) Germination ecology of Central Asian *Stipa* spp: differences among species, seed provenances, and the importance of field studies *Plant Ecol.*, 196,269–280.

Shu, K., Meng, Y.J., Shuai, H.W., Liu, W.G., Du, J.B., Liu, J. & Yang, W. Y. (2015). Dormancy and germination: How does the crop seed decide? *Plant Biol* (Stuttg), 17(6):1104-12. doi: 10.1111/plb.12356.

Stirk, W.A., Ördög, V., Van Staden, J. & K. Jäge, K. (2002). Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 14, 215–221.

Stirk WA, Ördög V, Novák O, Rolčík J, Strnad M, Bálint P, van Staden J. 2013. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains. *J Phycol* 49:459–467.

Tassara CA, Stella AM, Sokn MC, López SE, Carmarán CC. 2012. Efecto de *Nostocmuscorum* AG. en la germinación ‘in vitro’ de esporangios de *Bremialactucae*Regel en *Lactuca sativa* L. *Rev. Agronomía & Ambiente* 32(1-2): 1-8. FA-UBA, Buenos Aires, Argentina.

Zaccaro de Mule MC, Caire G, Cano M, Palma M, Colombo K. 1999. Effect of cyanobacterial inoculation and fertilizers on rice seedlings and post-harvest soil structure. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 30: 97- 107.

Zuloaga FO, Rugolo ZE, Anton AM. 2012. Flora Vascular de la República Argentina. Volumen 3, Tomo 2. 1ra Edición. Ediciones Gráficamente. 2012. Argentina (Córdoba).

## 8 ANEXOS.

### 8.1 ANEXO A: Planilla de recuento celular.

										TABLA DE RECUESTO CELULAR									
Fecha de inicio: 04/10/2017										Responsable: Belén Miras									
Medio: Efluente de matadero										Luz: 2700 lux									
										Fotoperíodo: 12 : 12									
										Temperatura: 23 ± 0,5 °C									
										Volumen: 2500 mL									
<b>Especie: <i>Scenedesmus brevispina</i></b>										Densidad inicial: 57500 cél/mL									
Codigo y origen de la cepa: adaptada al efluente de matadero																			
Detalles:																			
Ritmo del ensayo: MA																			
FECHA	TEMP	DA	n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	n8	MEIA	DESVO	F dilución	Ncél/mL					
05/10/2017	23	1	18	37	50	24	20	12	17	30	26,00	12,50	1	260.000					
06/10/2017	23	2	27	23	22	20	28	32	30	30	26,50	4,34	1	265.000					
07/10/2017	23	3	38	40	18	37	22	23	29	29	29,50	8,19	1	295.000					
08/10/2017	23	4	58	67	78	75	56	64	57	75	66,25	8,91	1	662.500					
09/10/2017	23	5	146	128	150	129	145	143	141	132	139,25	8,41	1	1.392.500					
10/10/2017	23	6	21	23	27	26	22	23	12	17	21,38	4,87	10	2.137.500					
11/10/2017	23	7	16	19	28	24	26	20	26	20	22,38	4,21	10	2.237.500					
12/10/2017	23	8	41	27	34	22	37	32	28	31	31,50	5,98	10	3.150.000					

## 8.2 ANEXO B: Planilla de seguimiento de germinación.

		PLANILLA DE SEGUIMIENTO DE GERMINACIÓN																					
		Especie: <i>Pappostipa humilis</i> (coirón llama)																					
Fecha		23-oct		24-oct		25-oct		26-oct		27-oct		28-oct		29-oct		30-oct		31-oct		01-nov			
ID	Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
		R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O
T0A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					2	0	0	0				
T0B		0	0	0	0	0	0	0	1	0	1					3	1	0	1				
T0C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1					1	0	1	0				
T1A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					1	0	0	0				
T1B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					1	0	2	0				
T1C		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0					1	0	0	0				
T2A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0	0	0	1				
T2B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0				
T2C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0				
T3A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0				
T3B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0				
T3C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0				
T4A		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0				
T4B		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0				
T4C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0	0	0	0				



T12 C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1					3	1	0	0		
Tota les		0	0	0	0	0	0	1	3	4	7	0	0	0	0	4	7	1	5	0	0
Tota les		0	0	0	0	0	0	2	6	8	1	0	0	0	0	8	1	2	1	0	0

	Fec ha	02-nov		03-nov		04-nov		05-nov		06-nov		07-nov		08-nov		09-nov		10-nov		11-nov	
ID	Dia	1		1		1		1		1		1		1		1		1		2	
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		0	
T0A		R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O	R	O
T0B		2	1							0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
T0C		0	0							0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
T1A		1	0							0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T1B		1	0							2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
T1C		0	0							2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0
T2A		0	0							3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
T2B		0	0							2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
T2C		0	0							0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
T3A		0	0							0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3B		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3C		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4A		0	0							0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4B		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4C		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5A		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5B		2	0							1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5C		1	0							1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6A		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6B		2	0							3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6C		3	2							2	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
T7A		0	0							1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7B		0	0							1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7C		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T8A		0	0							0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

T8B		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T8C		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T9A		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T9B		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
T9C		1	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T10 A		1	1							0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
T10 B		1	1							0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
T10 C		0	0							4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
T11 A		1	0							0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
T11 B		0	0							0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
T11 C		0	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T12 A		2	0							0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T12 B		1	0							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T12 C		1	0							0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tota les		0	1							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tota les		2	6	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	4	3	2	3	1	1	9	1
		3	1	0	0	0	0	0	0	4	2	2	2	7	5	4	6	2	2	1	2
		8	1							4	5	0								7	