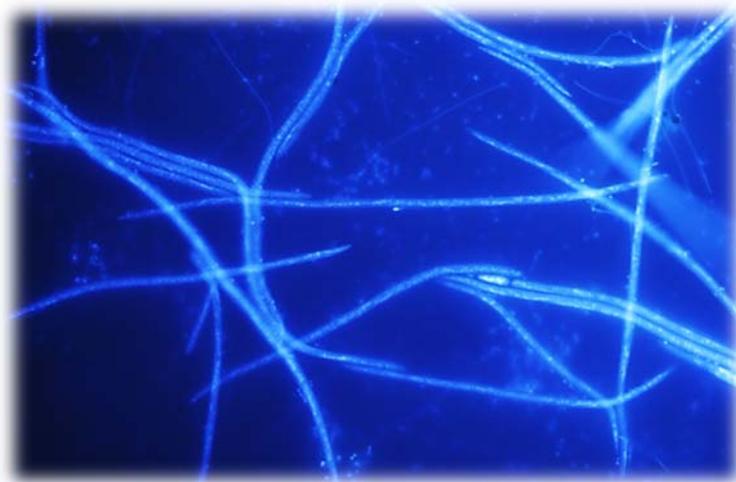


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

Tesis para optar por el grado de Licenciado en Bioquímica

**Floraciones de cianobacterias en condiciones limitantes de
nutrientes: influencia de la dinámica fisicoquímica vertical
en un lago suburbano estratificado.**



Giuliana Britos

Orientador: Dr. Luis Aubriot

Sección Limnología, Grupo de Ecología y Fisiología de Fitoplancton,
Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales. Facultad de Ciencias.

Noviembre, 2016.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mis padres y mi hermano por su constante motivación, sus buenas energías ante cada examen que rendí, su cariño y sobre todo por estar siempre apoyándome. A mi esposo Gustavo por su incansable apoyo y ondas positivas que me motivan siempre a cumplir mis objetivos.

Le agradezco especialmente a mi tutor Luis por la gran oportunidad que me brindó, por sus aportes, por la paciencia y por el tiempo dedicado durante toda la pasantía.

A mis compañeros de la Sección Limnología por recibirme tan bien, sobre todo a Fátima a Federica y Andrea por la inmensa ayuda en las salidas de campo, en los experimentos y en las horas de microscopio en el IIBCE. Al Departamento de Microbiología del IIBCE por la colaboración. Especialmente quiero agradecerle a Federica por brindarme datos no publicados de su tesis de grado.

A las amigas y compañeros que tuve la suerte de conocer durante estos años de Facultad, con las que compartí horas de estudio, trabajo, nervios, bajones, risas y que siempre me hicieron el aguante.

Índice

1. Resumen	4
2. Introducción	5
2.1 Floraciones de cianobacterias	5
2.2 Disponibilidad y reserva de nutrientes	7
2.3 El caso de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	11
2.4 <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> en Uruguay	13
3. Objetivos	15
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. Hipótesis y Predicciones	16
4.1 Hipótesis	16
4.2 Predicción 1.1	16
4.3 Predicción 1.2	17
5. Materiales y Métodos	17
5.1 Diseño experimental	17
5.2 Estimadores de biomasa fitoplanctónica	18
5.2.1 Abundancia y biovolumen	18
5.2.2 Concentración de Clorofila <i>a</i>	19
5.3 Cuantificación de nutrientes	20
5.4 Estado fisiológico: reserva de polifosfatos	21
5.5 Datos meteorológicos	22
5.6 Análisis de datos	22
6. Resultados	24
6.1 Histórico de datos meteorológicos	24
6.2 Perfiles verticales de variables abióticas	26
6.3 Relaciones entre variables fisicoquímicas	28
6.4 Pigmentos indicadores de biomasa fitoplanctónica	32
6.5 Estructura de las comunidades fitoplanctónicas	37
6.6 Cuantificación de nutrientes	40
6.7 Reserva en gránulos de polifosfato	43
7. Discusión	47
7.1 Comportamiento de las variables fisicoquímicas	47
7.2 Indicadores de cianobacterias	49
7.3 Estado fisiológico y reserva en gránulos de polifosfato	51
8. Conclusiones y perspectivas	53
9. Referencias	55

1. Resumen

El estado trófico de los ecosistemas acuáticos se ve alterado por acciones antrópicas como aportes puntuales de desechos orgánicos urbanos, domésticos e industriales, y los aportes difusos por escorrentía. Estas acciones provocan el crecimiento masivo (*bloom* o floración) de cianobacterias, organismos del fitoplancton de aguas continentales que pueden sintetizar sustancias tóxicas (cianotoxinas) con el consecuente perjuicio para la salud humana. Este fenómeno se intensifica en lagos suburbanos por el aporte de nutrientes de origen antrópico. Tal es el caso del Lago Javier que se encuentra en una zona suburbana de la Ciudad de la Costa (Canelones, Uruguay) y ha recibido grandes aportes de nutrientes. Este Lago se estratifica térmicamente lo que genera una zona anóxica profunda y una gran heterogeneidad fisicoquímica vertical. En este Lago existen varios estudios sobre floraciones de cianobacterias neurotóxicas y hepatotóxicas, sin embargo, se desconoce cómo la estructura vertical del lago afecta su distribución vertical y estado fisiológico. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar la influencia de la dinámica fisicoquímica vertical en los indicadores de biomasa de cianobacterias (fluorescencia de pigmentos *in situ*) y en el estado fisiológico (reserva de fosfato) de las mismas en el Lago Javier. Se realizaron muestreos quincenales de primavera a otoño, durante el período de estratificación térmica y mezcla parcial. Este trabajo muestra el efecto de la estratificación térmica en la deficiencia por fosfato de las cianobacterias y su capacidad de obtener nutrientes de las capas profundas para sustentar su crecimiento. El estudio de los gradientes verticales fisicoquímicos es fundamental para la comprensión de los factores que favorecen el desarrollo y persistencia de floraciones de cianobacterias.

2. Introducción

2.1 Floraciones de cianobacterias

Las cianobacterias son organismos procariotas fotoautótrofos a los que se les atribuye ser responsables de la atmósfera oxidante que hoy conocemos (Whitton & Potts, 2000). Poseen gran plasticidad fisiológica que les confiere la capacidad de adaptarse a condiciones extremas de disponibilidad de luz, nutrientes y temperatura en diversos cuerpos de agua (Whitton & Potts, 2000). Habitan ecosistemas marinos y continentales (límnicos) y tienen la capacidad de crecer masivamente en el fitoplancton formando floraciones de una o pocas especies (*blooms*) en periodos cortos de tiempo. Además, estas floraciones pueden permanecer en el tiempo por varios meses e incluso ser permanentes en el cuerpo de agua (Reynolds, 1993; Carey *et al.*, 2012).

Las floraciones de cianobacterias disminuyen la diversidad biológica en los distintos niveles tróficos y son capaces de producir compuestos aromáticos secundarios (geosminas y 2-metilisoborneol) que provocan mal olor, mal sabor y aspecto visual desagradable en el agua (Izaguirre *et al.*, 1982). Además, son potenciales productoras de metabolitos denominados cianotoxinas (Chorus & Bartram, 1999; Bonilla *et al.*, 2015) que incluyen las familias de las microcistinas, cylindrospermopsinas, anatoxinas y saxitoxinas (Leflaive & Ten-Hage, 2007). Estos metabolitos representan un importante riesgo sanitario, puesto que poseen efectos perjudiciales tanto

para la biota presente en la columna de agua, como para animales y el propio humano. Lo que puede resultar en la inhabilitación de los servicios del ecosistema acuático como recurso para potabilización, riego, pesca y/o recreación (Huisman & Visser, 2005; Bonilla, 2009; Lehman *et al.*, 2010).

En Uruguay el fenómeno de floraciones de cianobacterias es cada vez más frecuente y se ha detectado en zonas embalsadas del Río Negro y Río Uruguay, las costas del Río de la Plata y varios lagos o lagunas costeras (Bonilla *et al.*, 2015). La mayoría de estas zonas tienen actividades recreativas, lo que aumenta el riesgo de exposición a cianotoxinas u otros problemas sanitarios para los potenciales usuarios de estos cuerpos de agua. Sobre todo en el período estival (Bonilla *et al.*, 2015).

La disponibilidad de nutrientes en el ambiente acuático y la temperatura son factores importantes que desencadenan las floraciones algales. Un aporte excesivo de nutrientes, principalmente fósforo (P) y nitrógeno (N) lleva a la fertilización de los ecosistemas acuáticos, fenómeno denominado eutrofización (Reynolds, 2006). Mientras que el aumento de temperatura incrementa las tasas de crecimiento, modifica las condiciones hidrodinámicas de los ecosistemas acuáticos y extiende el período de estratificación térmica. Explicando que las floraciones sean frecuentes durante el período estival en sistemas eutróficos (Paerl & Huisman, 2008). Sin embargo, existen estudios que han puesto en duda la hipótesis que el

aumento de la temperatura por el calentamiento global sea el principal factor responsable del aumento de las tasas de crecimiento de las cianobacterias, puesto que se registran poblaciones dominantes a bajas temperaturas (Lüring *et al.*, 2013; Bonilla *et al.*, 2012; Cremella, 2014).

2.2 Disponibilidad y reserva de nutrientes

En ambientes eutróficos, los nutrientes disueltos son rápidamente incorporados en la gran biomasa de fitoplancton, disminuyendo la disponibilidad de estos en la columna de agua y por ende, limitando el crecimiento (Bonilla, 2009). A su vez, el fenómeno de eutrofización disminuye la luz disponible en el cuerpo de agua. Por lo tanto, la presencia y permanencia de floraciones en sistemas eutróficos va a depender de la capacidad de adaptación de las cianobacterias a condiciones limitantes de algún recurso, ya sea deficiencia de nutrientes disueltos o de luz suficiente para su crecimiento (Dignum *et al.*, 2005; Reynolds, 2006). A partir de la fertilización de los cuerpos de agua y posterior aumento de la producción primaria, ocurren una serie de eventos que se retroalimentan positivamente (Bonilla, 2009). Se favorece la turbidez, el sombreado de la columna de agua y el oxígeno disuelto es consumido en la degradación microbiana de la biomasa en descomposición. Estos eventos conducen a la anoxia en capas profundas, principalmente en condiciones de estratificación térmica durante el periodo estival (Bonilla, 2009). La anoxia en capas profundas,

promueve mecanismos fisicoquímicos que favorecen la liberación de la carga interna de nutrientes desde el sedimento. Bajo condiciones de oxigenación, el fosfato (PO_4^{3-}) es retenido en el sedimento como flóculos de hidróxido de hierro ($\text{Fe}(\text{OH})_3$). Durante la anoxia ocurren reacciones fisicoquímicas de reducción de óxidos metálicos que liberan el PO_4^{3-} del sedimento (Kalff, 2002). Esta carga interna de PO_4^{3-} liberada, contribuye a estimular aún más la producción primaria y fomentar las floraciones de cianobacterias (Bonilla, 2009). A su vez, el amonio (NH_4^+) se acumula en el hipolimnion anóxico por mineralización de materia orgánica y reducción de nitrato (NO_3^-). Una vez que la estratificación se rompe, estos nutrientes quedan disponibles para el crecimiento del fitoplancton y bacterias heterótrofas en la zona eufótica.

Los requerimientos nutricionales del fitoplancton y de cianobacterias se aproximan a la relación estequiométrica teórica de Redfield (1958). Dicha relación establece que la composición atómica del plancton de 106 átomos de carbono (C) por cada 16 de N y 1 de P (106C:16N:1P) se asociaría con las necesidades metabólicas de los organismos. Si la cuota celular de N y P se aparta de esa relación, ocurre un déficit nutricional y limitación del crecimiento celular. En condiciones ambientales óptimas, las cianobacterias pueden obtener N por la incorporación de las fracciones inorgánicas disueltas NH_4^+ , nitrito (NO_2^-) y (NO_3^-). Además, algunas cianobacterias tienen la capacidad de fijar N atmosférico a través de

células especializadas llamadas heterocitos (Orden Nostocales y Stigonematales) (Wolk *et al.*, 1994). Los heterocitos pueden formarse bajo condiciones ambientales deficientes de N (cianobacterias planctónicas, en general) o ser constitutivos, como el caso particular de las cianobacterias bentónicas (Bonilla, 2009). A su vez, las cianobacterias son capaces de regular su posición en la columna de agua mediante vesículas de gas. Dichas vesículas, permiten a las cianobacterias regular el acceso a nutrientes disponibles en capas profundas, la exposición a la luz y la tasa de hundimiento (Oliver & Ganf, 2000). Por lo tanto, la capacidad de fijar N atmosférico junto con la facultad de migrar en la columna para acceder a fuentes de N inorgánico epilimnético y bentónico, le confieren a las cianobacterias la ventaja de crecer en ambientes limitados por N (Ferber *et al.*, 2004).

Entre los nutrientes más importantes está el P, un elemento esencial para el funcionamiento de organismos debido a su participación en diversos mecanismos vitales, como en la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos de membrana y en la transferencia de energía a través de los nucleótidos ATP y ADP (Rigler, 1956). Este nutriente es frecuentemente limitante de la productividad primaria, puesto que generalmente se encuentra por debajo de las concentraciones necesarias para el crecimiento fitoplanctónico (Schindler, 1977; Hudson *et al.*, 2000). En sistemas límnicos, el P se encuentra en la forma de ortofosfato (PO_4^{3-}), o también conocido como fósforo reactivo soluble (PRS) por su

determinación analítica y reacción con molibdato de amonio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄). A pesar de un aporte alto, bajo o esporádico de PO₄³⁻, las cianobacterias tienen la capacidad de adaptarse fisiológicamente a las fluctuaciones ambientales de este nutriente ajustando sus propiedades de asimilación para optimizar su crecimiento (Aubriot *et al.*, 2000; Aubriot *et al.*, 2011). Cuando el PO₄³⁻ está disponible, es rápidamente incorporado por los organismos del fitoplancton hasta que la concentración del nutriente decrece a valores nanomolares (valor umbral), donde la incorporación no es energéticamente posible. Para que esta situación se revierta, la concentración externa de PO₄³⁻ debe sobrepasar dicho valor umbral (Falkner *et al.*, 1989; Aubriot *et al.*, 2000). Una contribución abrupta de PO₄³⁻ al medio acuático (pulso), provoca la incorporación activa del nutriente y su posterior almacenamiento mediante la agregación de gránulos de polifosfatos intracelulares (Kulaev & Vagabov, 1983). En sistemas eutróficos, los aportes de PO₄³⁻ pueden darse en forma de pulsos de concentración que pueden ser incorporados rápidamente por las cianobacterias y formar floraciones en los días sucesivos, debido a que estos organismos son capaces de ajustar en minutos sus propiedades energéticas y cinéticas de captación de PO₄³⁻ (Aubriot & Bonilla, 2012).

2.3 El caso de *Cylindrospermopsis raciborskii*

Cylindrospermopsis raciborskii es una cianobacteria filamentosa perteneciente al Orden Nostocales. Capaz de desarrollar células de resistencia (acinetes) en condiciones de estrés ambiental, y de regular su flotabilidad en la columna de agua, a través de vesículas de gas para acceder fácilmente a nutrientes que se liberan desde el sedimento o para obtener mejor calidad de luz (Padisák, 1997; Bonilla, 2009). Posee la capacidad de fijar N atmosférico a través de la diferenciación de células vegetativas a células especializadas llamadas heterocitos, en deficiencia de N inorgánico disuelto (Padisák, 1997). Sin embargo, la fijación de N atmosférico puede estar ausente en esta especie, aún en presencia de heterocitos (Ferber *et al.*, 2004). *C. raciborskii* forma floraciones potencialmente tóxicas en sistemas de agua dulce, principalmente en sistemas lénticos (Fabre *et al.*, 2010). Es capaz de producir varias toxinas, como la neurotoxina llamada saxitoxina, inhibitoria de los canales de sodio y por consiguiente de la transmisión nerviosa, lo que induce la parálisis muscular (grupo de toxinas PSP, *paralytic shellfish poison*) (Chorus & Bartram, 1999).

Cylindrospermopsis raciborskii es una especie con comportamiento invasor que originariamente se describió como tropical (Padisák, 1997), pero en los últimos tiempos ha colonizado zonas subtropicales y templadas de todo el mundo (Vidal & Kruk, 2008; Bonilla, 2009; Sinha *et al.*, 2012). La

expansión de esta especie hacia climas templados se puede explicar debido a sus ventajas competitivas frente a otros organismos formadores de floraciones. Por ejemplo, Bonilla *et al.* (2012) mostraron que *C. raciborskii* es fisiológicamente más flexible que *Planktothrix agardhii* (orden Oscillatoriales), lo que le permite explotar un amplio rango de condiciones. Presenta además ecotipos que exhiben diferentes fajas de tolerancia a las condiciones ambientales, facilitando su expansión a diversas regiones (Piccini *et al.*, 2011; Bonilla *et al.*, 2012). Es descripta como especie con tolerancia a la sombra “shade-tolerants”, con intensidades lumínicas menores a $30 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Briand *et al.*, 2004). Sin embargo, se han obtenidos datos muy variables en diferentes estudios que revelan que esta especie es capaz de aclimatarse y crecer en un amplio rango de intensidades de luz (Mehnert *et al.*, 2010; Fabre *et al.*, 2010; Fabre, 2011).

La alta afinidad por el PO_4^{3-} y capacidad de almacenamiento en gránulos de polisfosfato, es otra característica que le confiere a *C. raciborskii* una ventaja adaptativa frente a las variaciones ambientales. Puesto que, le permite crecer a bajas concentraciones del mismo (Istvánovics *et al.*, 2000; Amaral *et al.*, 2014). La flexibilidad fenotípica de *C. raciborskii* le permite adaptarse fisiológicamente a cambios en la disponibilidad de PO_4^{3-} , optimizando su tasa de crecimiento con una regulación rápida (en minutos) del consumo de PO_4^{3-} en sistemas acuáticos con concentraciones fluctuantes de este nutriente (Amaral, 2011; Aubriot &

Bonilla, 2012; Martigani, 2012; Amaral *et al.*, 2014). Si bien existen ecotipos de la especie con diferencias en la tasa de crecimiento, comparten la afinidad y eficiencia en el uso de este nutriente (Piccini *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2014).

2.4 *Cylindrospermopsis raciborskii* en Uruguay

En nuestro país, la eutrofización de los diversos sistemas límnicos en los últimos tiempos ha ido en aumento, debido a la creciente producción agrícola-ganadera y a la urbanización (Bonilla *et al.*, 2015). El registro de floraciones de *C. raciborskii* ha ido en aumento, siendo detectadas principalmente en el Lago Javier (Canelones), Laguna del Sauce y Laguna Blanca (Maldonado); y en algunos tajamares de Rocha (Vidal & Kruk, 2008; Fabre *et al.*, 2010; Bonilla *et al.*, 2015).

El Lago Javier se ubica en el parque Miramar del departamento de Canelones, Uruguay. Se trata de un Lago artificial formado por la extracción de arena que se rodea de viviendas con uso recreativo por los pobladores del lugar (Vidal & Kruk, 2008, Somma *et al.*, 2013). Este Lago no tiene afluentes de cursos de agua superficiales y se nutre principalmente del aporte de agua subterránea. Según Somma (2013) este Lago se clasifica como eutrófico debido a su elevada carga de nutrientes y alta concentración de clorofila *a* (entre 55 y 150 $\mu\text{g l}^{-1}$). El Lago sustenta

una alta biomasa fitoplanctónica dominada por cianobacterias filamentosas, con floraciones de *C. raciborskii* en verano. Estudios recientes sobre la dinámica de nutrientes en el Lago Javier (Federica Hirsch com. pers.) muestran que la concentración de PO_4^{3-} en la superficie durante la floración es baja e indetectable, mientras que las concentraciones de fondo (hipolimnéticas) son altas. Por lo tanto, no se conoce si la floración de *C. raciborskii* soporta las condiciones de estrés por PO_4^{3-} o se nutre de aportes de PO_4^{3-} desde las capas profundas. En este sentido, la evaluación de la presencia de gránulos de polifosfato intracelular permitiría inferir que los organismos acceden a pulsos esporádicos de PO_4^{3-} (Aubriot *et al.*, 2011), mediante la migración vertical de los organismos hacia capas ricas en el nutriente y/o por el flujo vertical ascendente (difusión por mezcla parcial).

El fenómeno de floraciones de cianobacterias es una de las principales amenazas del uso de los recursos de agua, sumado al importante incremento de floraciones reportados en los diferentes ecosistemas lénticos de nuestro país (Bonilla *et al.*, 2015). Considerando que los sistemas de monitoreo de los principales factores fisicoquímicos e indicadores fisiológicos de cianobacterias se realizan en la zona superficial, este trabajo busca evaluar la dinámica de la estructura vertical de un lago estratificado dominado por cianobacterias. El aporte al conocimiento de los factores que favorecen el desarrollo de floraciones de cianobacterias y su

persistencia en el ambiente, son fundamentales para avanzar hacia la predicción y mitigación de este fenómeno.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar el estado fisiológico de poblaciones de cianobacterias florecedoras en la columna de agua de un lago eutrófico durante el período de estratificación térmica.

3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la dinámica vertical de los parámetros fisicoquímicos.
2. Analizar la distribución vertical de las cianobacterias con indicadores de biomasa *in situ* y análisis de clorofila *a*.
3. Evaluarla influencia de la estratificación térmica en la deficiencia por PO_4^{3-} de las cianobacterias dominantes.

4. Hipótesis y Predicciones

4.1 Hipótesis

Las cianobacterias poseen múltiples ventajas adaptativas que han permitido su expansión en diferentes latitudes. Sobre todo la cianobacteria invasora potencialmente tóxica *Cylindrospermopsis raciborskii*, especie frecuentemente dominante del Lago Javier. En estudios previos se ha planteado que esta cianobacteria posee una gran flexibilidad fenotípica, que sumada a la presencia de diferentes ecotipos, le permite explorar y adaptarse a un amplio rango de condiciones ambientales. Sobre todo, la eficiencia de *C. raciborskii* en la captación PO_4^{3-} y gran capacidad de almacenamiento en gránulos de polifosfato, le permite crecer y dominar en ambientes con concentraciones bajas e incluso indetectables del nutriente. Como ocurre durante el período de estratificación térmica. Por lo tanto, es posible plantear la siguiente hipótesis:

La dominancia de *Cylindrospermopsis raciborskii* durante la estratificación será sustentada por el aporte de PO_4^{3-} desde capas profundas (hipolimnion) enriquecidas con el nutriente.

4.2 Predicción 1.1

Dado que la deficiencia por nutrientes será mayor en el período de estratificación térmica. Se determinará una baja concentración de PO_4^{3-} y NH_4^+ disponible en la zona de mayor biomasa e indicadores pigmentarios.

4.3 Predicción 1.2

Se determinará la presencia de gránulos de polifosfato intracelular en los tricomas de *C. raciborskii*, en condiciones de PO_4^{3-} ambiental no detectable durante la estratificación térmica.

5. Materiales y Métodos

5.1 Diseño experimental

Se realizaron 8 muestreos con frecuencia quincenal en Lago Javier, ubicado en el Parque Miramar de la Ciudad de Canelones (34° 51' S, 56° 02' W, área 10 Ha, profundidad máxima 9,8 m según Vidal & Kruk, 2008), durante el periodo estival. Desde noviembre 2013 hasta abril 2014 en un punto central con profundidad aproximada de 9 metros. En cada muestreo se tomaron medidas *in situ* y muestras de agua cada 1 metro de profundidad (desde la superficie hasta el fondo) para su posterior análisis químico, taxonómico y fisiológico. Todas las muestras de lago se tomaron con botella muestreadora tipo Ruttner de 1 litro de capacidad y fueron colectadas en botellas plásticas rotuladas de 300 mL, guardadas en oscuridad y refrigeradas hasta su posterior análisis en el laboratorio de Limnología. Las muestras para el análisis cuantitativo fueron inmediatamente fijadas con 5-6 gotas de Lugol en el laboratorio de Limnología y conservadas a temperatura ambiente.

In situ se midieron desde la superficie hasta el fondo los perfiles verticales de los principales factores abióticos: luz fotosintéticamente activa (PAR) cada 10 cm de profundidad para determinar el coeficiente de extinción (K_d) y la profundidad de la zona eufótica (fotoradiómetro Li –Cor 4π), temperatura y oxígeno disuelto cada 20 cm de profundidad (sensor Horiba) y la transparencia del agua utilizando la profundidad del Disco de Secchi. Se midió la fluorescencia de los pigmentos clorofila *a* y ficocianina en cada metro de profundidad con fluorómetro (TurnerDesigns, Aquafluor) y la conductividad (con HoribaNavih) y pH (pHTester 20) en las muestras de superficie y fondo.

5.2 Estimadores de biomasa fitoplanctónica

5.2.1 Abundancia y biovolumen

Se realizó una muestra integrada de cada fecha de muestreo a partir de las botellas fijadas con lugol. Para ello, se tomaron 5 mL de cada metro (se tomaron muestras en botella cada 1 metro de profundidad) desde la superficie hasta el fondo. Luego se integraron de manera de obtener una única muestra integrada representativa por fecha de muestreo. A partir de las mismas, se cuantificó por el método de Uthermöhl (1958) la densidad de organismos por unidad de volumen de agua (abundancia en cel. mL^{-1}) utilizando cámaras de Sedgwick-Rafter. Para las muestras más densas se

utilizaron cámaras de 1 mL contando campos y en las menos densas se utilizaron cámaras de 3 mL contando bandas, ambas cámaras a 40 X en microscopio OLYMPUS invertido CKX41. En todos los casos el criterio utilizado fue contar campos o bandas al azar hasta alcanzar 100 individuos. Se determinaron los parámetros morfológicos de las 3 especies más dominantes en cada muestreo, midiendo ancho (a 100X) y largo de la dimensión máxima (a 40X) utilizando un microscopio invertido OLYMPUS CKX41. Luego se estimó el biovolumen ($\text{mm}^3 \text{ mL}^{-1}$) multiplicando la abundancia por el volumen específico de cada organismo, que fue calculado de acuerdo a formas geométricas sencillas aproximadas a la forma del organismo (Hillebrand *et al.*, 1999).

5.2.2 Concentración de Clorofila a

Se estimó la concentración global de clorofila a presente en las muestras de lago a partir de sub muestras de cada botella, de manera de obtener datos por duplicado. Para ello se filtró una alícuota de volumen conocido de cada sub muestra por un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/C. Los filtros con el material retenido fueron colocados en tubos Falcon de 10 mL y preservados en oscuridad a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se extrajo el pigmento presente en los filtros por transferencia al etanol caliente, según el método Nusch (1980), ISO (1992), modificado por Bonilla

(2009). La concentración de clorofila *a* se cuantificó por absorbancia a 665 y 750 nm con un espectrofotómetro Evolution 60 (ThermoScientific), según a ecuación:

$$\text{Clo } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = 29,6 * [(A_{665} - A_{750}) - (A_{a665} - A_{a750})] * (V_e/V_m)L$$

Donde:

A_{665} y A_{750} son las absorbancia del extracto a 665 y 750 nm, respectivamente.

A_{a665} y A_{a750} son las absorbancias del extracto acidificado a 665 y 750 nm, respectivamente.

V_e corresponde al volumen de etanol ppa. al 90% utilizado en la extracción (8 mL por muestra).

V_m corresponde al volumen de muestra filtrada.

L corresponde al trayecto óptico de la celda utilizada, en este trabajo se utilizaron celdas de 1 cm.

5.3 Cuantificación de nutrientes

Se utilizaron los filtrados de las muestras correspondientes a las fechas de muestreo 30/01/2014, 18/01/2014 y 20/03/2014 para conocer la disponibilidad de nutrientes disueltos desde la superficie hasta el fondo, en los meses de mayor temperatura. Se determinó la concentración de PO_4^{3-}

por el método de molibdato de amonio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄) (Murphy & Riley, 1962) y la concentración NH₄⁺ por el método de azul de indofenol (Koroleff, 1970). Para los análisis colorimétricos se utilizó espectrofotómetro Evolution 60 (ThermoScientific).

5.4 Estado fisiológico: reserva de polifosfatos

Para evaluar el PO₄³⁻ almacenado como gránulos de polifosfato en la comunidad de cianobacterias presentes en los muestreos, se realizó microscopía de epifluorescencia con tinción con el marcador 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Utilizando las muestras del perfil vertical de agua tomadas a cada metro y en las fechas donde se identificó más de un mes de estratificación (30/01/2014) y el final de la misma (20/03/2014) o con la termoclina profunda (mezcla parcial), próxima al sedimento. Se tomaron 4,5 mL de cada muestra y se le agregaron 0,5 mL de paraformaldehído (PFA) 10% en viales de volumen final de 5 mL (relación 1:1). Los viales fueron conservados en heladera. Luego se realizó la tinción de los polifosfatos intracelulares presentes en los filamentos con el marcador fluorescente DAPI (Mesquita *et al.*, 2014). La fluorescencia del complejo DAPI-polifosfato (Aschar-Sobbi *et al.*, 2008) y posteriores imágenes para el análisis cualitativo de la acumulación de polifosfatos intracelular se obtuvieron en microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 (IX81

motorized inverted microscope) U-MWU2. Objetivos 40X. Filtro N° 5. Onda de excitación: 330 – 385nm, onda de emisión: 420nm Olympus, ubicado en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

5.5 Datos meteorológicos

Con los datos reportados durante el período estival por la estación meteorológica 865800 (SUMU) de Carrasco, Latitud: -34.83 | Longitud: -56 | Altitud: 32, se realizó un histórico día a día y mes a mes de las principales variables climáticas que tienen efecto directo sobre la población de cianobacterias: la precipitación total de lluvia en mm (PP), por la lixiviación de nutrientes de la zona de escurrimiento litoral hacia las capas superficiales del lago. Y la velocidad máxima sostenida del viento en Km/h (VM), por su capacidad de profundizar la zona de mezcla mediante la erosión del metalimnion.

5.6 Análisis de datos

Se calculó el coeficiente de extinción de la luz (K_d , m^{-1}) en cada fecha a partir de la pendiente obtenida en la curva $\ln(\text{PAR})$ vs. profundidad máxima de muestreo (m). Siendo PAR la radiación

fotosintéticamente activa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Se analizaron regresiones lineales entre los tres pigmentos indicadores de biomasa de fitoplancton (fluorescencia *in vivo* de clorofila *a* y ficocianina y la clorofila *a* por extracción). Y la relación de estos pigmentos con los cambios en la concentración de nutrientes en los meses de estratificación (30/01/2014 y 18/02/2014) y mezcla parcial (20/03/2014) a través de correlaciones no paramétricas de Spearman. También se calculó la relación ficocianina/clorofila *a* para conocer la contribución de cianobacterias en la biomasa de fitoplancton. Para ello, se usaron los valores de ambos pigmentos indicadores en cada muestreo, agrupados en superficie y fondo. A su vez, se realizaron correlaciones no paramétricas de Spearman con todas las variables bióticas y abióticas medidas en la columna de agua, para analizar las asociaciones significativas entre las mismas. Para determinar si existían diferencias significativas de biomasa en el período de estratificación (30/01/2014) y mezcla (20/03/2014) se realizaron Análisis de Varianza (ANAVA) de una vía para los datos de biovolumen (factores estratificación o mezcla) y ANAVA de dos vías para los datos de pigmentos, agrupados en superficie o fondo y estratificación o mezcla. Para todos los análisis se utilizó el programa SigmaPlot 11.0.

6. Resultados

6.1 Histórico de datos meteorológicos

Las precipitaciones estuvieron presentes en todos los meses de los muestreos (Fig. 1b), registrándose máximos de precipitación en los meses de febrero (93 mm aproximadamente) y enero (68 mm). Estos máximos de precipitaciones sucedieron en los días previos a los muestreos del 30/01/2014 y 18/02/2014. Respecto a los vientos (Fig. 1a) se observó un comportamiento mensual similar durante el período de muestreo, con máximas en el entorno de los 40 - 45 Km/h en los meses de enero y abril. La mayor temperatura del aire (línea roja continua en la figura) se registró en el mes de diciembre, correspondiente al mes con menores precipitaciones. La temperatura fue decreciendo en los meses de enero y febrero, en contraposición de las precipitaciones que registraron sus máximos en dichos meses.

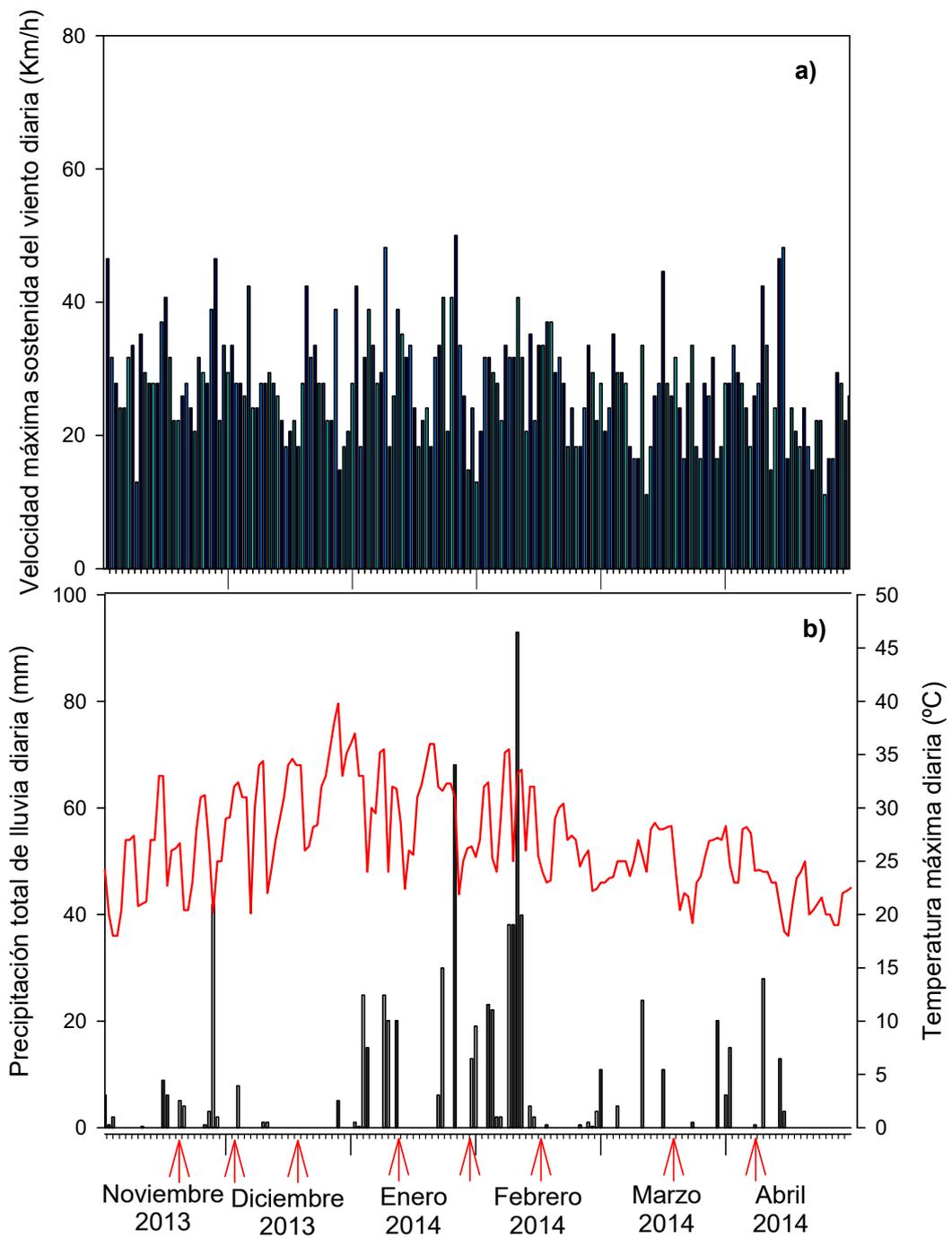


Figura 1. Datos meteorológicos reportados en el período de muestreo. En gráfico **a)** datos diarios de la velocidad máxima sostenida del viento (Km/h) y en gráfico **b)** precipitación total de lluvia diaria (mm). Las flechas rojas indican el día de muestreo y la línea continua roja corresponde a la temperatura máxima diaria del aire (°C).

6.2 Perfiles verticales de variables abióticas

El comportamiento de la termoclina en cada muestreo (Fig. 2) evidenció un calentamiento de las capas superiores de la columna de agua desde noviembre a febrero (estratificación térmica) y un enfriamiento a partir de marzo hasta su desaparición (mezcla parcial). En los meses de diciembre y marzo se registraron temperaturas máximas en la superficie del lago de 26.5 y 25.0°C, respectivamente. La profundidad de la zona eufótica (Zeu) fue similar en todos los muestreos, alcanzando cómo máximo 2.1 m (fecha 20/12/2013) y un mínimo de 1 m de profundidad (09/04/2014). A su vez, la profundidad de la Zeu fue menor a la profundidad de la zona de mezcla (Zme) en todos los muestreos, estableciendo cocientes de relación Zeu/Zme menores a 1. En la fecha 20 de diciembre se observó el valor Zeu/Zme más próximo a 1 (0.9). El oxígeno disuelto (OD) fue decreciendo desde la superficie hasta el fondo del lago y tendió a valores de hipoxia y anoxia a partir de la profundidad de la termoclina en la mayoría de los muestreos, exceptuando el muestreo del 30 de enero.

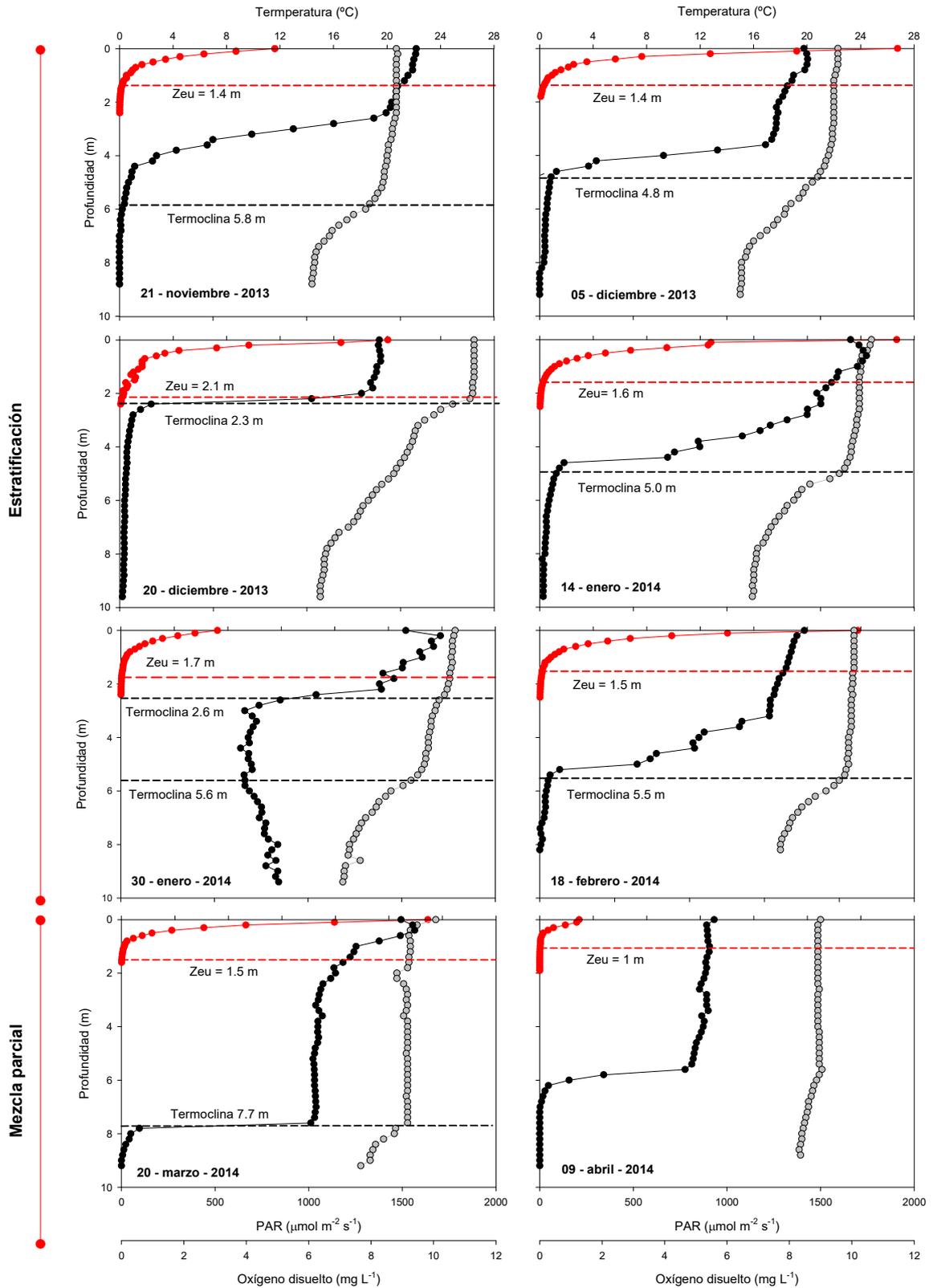


Figura 2. Comportamiento vertical de las variables abióticas en cada muestra realizado. Se muestran: Temperatura (puntos grises), Oxígeno Disuelto (puntos negros) y Luz fotosintéticamente activa, PAR (puntos rojos). Las líneas espaciadas rojas indican la profundidad de la zona eufótica (Zeu). Líneas espaciadas negras la profundidad de la termoclina.

6.3 Relaciones entre variables fisicoquímicas

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la correlación de Spearman sólo entre los pares de variables que mostraron alguna relación, es decir, con valores $p \leq 0.05$. La profundidad de la Zeu mostró relaciones positivas con el cociente Zeu/Zme, el Kd, el pH, temperatura de superficie y con el OD de fondo. A su vez, se observaron relaciones negativas (inversamente proporcionales) entre la Zeu y la Zme, los pigmentos ficocianina por fluorescencia y clorofila *a* por extracción y el biovolumen de *P. agardhii*. El coeficiente Zeu/Zme (indicador de la exposición de los organismos a la luz) tuvo relaciones positivas con el Kd y la temperatura de superficie e inversas con los pigmentos indicadores de biomasa clorofila *a* por extracción y ficocianina por fluorescencia, biovolumen de *P. agardhii* y el biovolumen total de cianobacterias. Los pigmentos indicadores se correlacionaron fuertemente entre sí, y tanto la clorofila *a* por extracción como la ficocianina por fluorescencia mostraron relaciones positivas con el biovolumen de *P. agardhii*. Sin embargo, ninguno de los pigmentos se correlacionó con el biovolumen de *C. raciborskii* o *Aphanizomenon sp.* La clorofila *a* por fluorescencia (de superficie y fondo) mostró relación negativa con el OD de fondo. Además, la clorofila *a* por fluorescencia de superficie se relacionó positivamente con la Zme. Respecto al biovolumen de *C. raciborskii*, se encontraron relaciones negativas con la transparencia del Disco de Secchi (DS) y el biovolumen de *Aphanizomenon sp.*, indicando

que el aumento de biomasa de *C. racirboskii* disminuye la transparencia de la columna de agua e influye negativamente en el crecimiento de *Aphanizomenon sp.* También se observó que el biovolumen de *Aphanizomenon sp.* se relaciona negativamente con la temperatura del fondo del lago. Se observaron relaciones proporcionales entre el biovolumen total de cianobacterias y el biovolumen de *C. racirboskii* e inversas para el biovolumen de *Aphanizomenon sp.* Sin embargo, no se encontró relación entre el biovolumen total y el biovolumen de *P. agardhii*. La velocidad máxima sostenida del viento promedio (VM prom.) influyó negativamente sobre la concentración de OD en la superficie y marginalmente con el OD de fondo. Esta relación significativa muestra los efectos del viento sobre la mezcla vertical parcial, ya que capas de agua reductoras se mezclan con capas más superficiales con OD.

Tabla 1. Matriz de coeficientes de correlación de Spearman de los valores significativos, con $p \leq 0,05$ para: profundidad de la zona eufótica (Zeu), profundidad de la zona de mezcla (Zme), cociente Zeu/Zme, coeficiente de extinción de la luz (Kd), profundidad del disco de Secchi (DS), pH en la superficie (pH sup.), temperatura de superficie (T sup.) y de fondo (T fondo), oxígeno disuelto en superficie (OD sup.) y fondo (OD fondo), clorofila a por extracción en superficie (Clo ext. sup.) y fondo (Clo ext. fondo), fluorescencia de ficocianina en superficie (Fico sup.) y fondo (Fico fondo), fluorescencia de clorofila a en superficie (Clo sup.) y en fondo (Clo fondo), biovolumen de *C. raciborskii* (BV Cyl), biovolumen de *P. agardhii* (BV Plank), biovolumen de *Aphanizomenon sp.* (BV Apha), biovolumen total de cianobacterias (BV-Ciano-TOT) y promedio de la velocidad máxima sostenida en el viento en la semana de muestreo (VM prom.) En las celdas de color gris se muestran los coeficientes de correlación y en blanco los p-valores.

	Zme	Zeu/ Zme	Kd	pH sup.	T sup.	OD fondo	Cloext sup.	Cloext fondo	Closu p.	Clo fondo	Ficosu p.	Fico fondo	BV Cyl	BV Plank	BV Apha	BV-Ciano TOT	Prom. VM	
Zeu	-0,76	0,84	0,72	0,73	0,96	0,73	-0,87	-0,43	-0,55	-0,53	-0,94	-0,78	-0,16	-0,81	-0,21	-0,39	-0,27	
	0,02	0,01	0,04	0,03	0,00	0,03	0,00	0,26	0,14	0,16	0,00	0,01	0,66	0,01	0,58	0,32	0,50	
Zme		-0,98	-0,80	-0,52	-0,74	-0,48	0,88	0,81	0,29	0,74	0,91	0,86	0,48	0,83	-0,25	0,76	0,10	
		0,00	0,01	0,16	0,03	0,21	0,00	0,01	0,46	0,03	0,00	0,00	0,21	0,01	0,54	0,02	0,79	
Zeu/Zme			0,86	0,63	0,81	0,53	-0,95	-0,74	-0,38	-0,69	-0,95	-0,83	-0,38	-0,91	0,14	-0,71	-0,12	
			0,00	0,09	0,01	0,16	0,00	0,03	0,32	0,05	0,00	0,01	0,32	0,00	0,71	0,04	0,75	
Kd				0,41	0,70	0,22	-0,95	-0,77	-0,23	-0,34	-0,86	-0,74	-0,25	-0,86	0,08	-0,65	0,22	
				0,29	0,05	0,58	0,00	0,02	0,54	0,39	0,00	0,03	0,50	0,00	0,84	0,07	0,58	
DS				-0,23	0,11	0,27	-0,33	-0,44	-0,11	-0,44	-0,33	-0,33	-0,76	-0,11	0,50	-0,66	-0,33	
				0,58	0,75	0,46	0,39	0,26	0,75	0,26	0,39	0,39	0,02	0,75	0,18	0,07	0,39	
pH sup.					0,61	0,41	-0,61	-0,10	-0,30	-0,27	-0,61	-0,38	0,05	-0,79	-0,04	-0,28	-0,33	
					0,10	0,29	0,09	0,79	0,46	0,50	0,09	0,32	0,89	0,01	0,89	0,46	0,39	
T sup.						0,76	-0,83	-0,52	-0,60	-0,65	-0,93	-0,85	-0,06	-0,74	-0,36	-0,28	-0,12	
						0,02	0,01	0,16	0,10	0,07	0,00	0,00	0,84	0,03	0,35	0,46	0,75	
T fondo							0,26	0,38	0,38	-0,14	0,10	0,19	0,05	0,69	0,41	-0,87	0,88	0,02
							0,50	0,32	0,32	0,71	0,79	0,62	0,89	0,05	0,29	0,00	0,00	0,93
OD sup.							0,36	-0,24	0,41	-0,29	0,07	-0,14	0,21	-0,05	-0,19	-0,03	-0,10	-0,76
							0,35	0,54	0,29	0,46	0,84	0,71	0,58	0,89	0,62	0,93	0,79	0,02
OD fondo								-0,46	-0,06	-0,76	-0,72	-0,64	-0,52	-0,11	-0,31	-0,43	-0,04	-0,64
								0,23	0,84	0,02	0,04	0,07	0,16	0,75	0,42	0,26	0,89	0,07

	Zme	Zeu/ Zme	Kd	pH sup.	T sup.	OD fondo	Cloext sup.	Cloext fondo	Closu p.	Clo fondo	Ficosu p.	Fico fondo	BV Cyl	BV Plank	BV Apha	BV-Ciano TOT	Prom. VM
Clo ext. sup.								0,69	0,38	0,50	0,95	0,79	0,26	0,93	-0,03	0,64	0,02
								0,05	0,32	0,18	0,00	0,01	0,50	0,00	0,93	0,07	0,93
Clo ext. fondo									-0,07	0,52	0,69	0,83	0,31	0,64	-0,22	0,62	-0,43
									0,84	0,16	0,05	0,01	0,42	0,07	0,58	0,09	0,26
Clo fondo											0,64	0,67	0,31	0,41	0,08	0,36	0,24
											0,07	0,06	0,42	0,29	0,84	0,35	0,54
Ficosup.												0,91	0,21	0,88	0,11	0,52	0,12
												0,00	0,58	0,00	0,75	0,16	0,75
Fico fondo													0,14	0,74	0,14	0,41	-0,07
													0,71	0,03	0,71	0,29	0,84
BV Cyl														0,10	-0,79	0,83	0,14
														0,79	0,01	0,01	0,71
BV Plank															-0,05	0,57	0,00
															0,89	0,12	0,98
BV Apha																-0,76	0,05
																0,02	0,89

6.4 Pigmentos indicadores de biomasa fitoplanctónica

Los pigmentos fotosintéticos indicadores de biomasa (fluorescencia de clorofila *a*, fluorescencia de ficocianina y la clorofila *a* por extracción), mostraron un comportamiento vertical similar entre ellos, desde la superficie hasta el fondo del lago en todo el período de muestreo (Fig. 3 a y b). Además, se observaron concentraciones variables de biomasa en cada muestreo, evidenciando la distribución vertical de los organismos presentes en cada fecha. Durante el período de estratificación térmica (fechas de noviembre a febrero) las mayores concentraciones de biomasa fitoplanctónica se evidenciaron en el epilimnion (capa superficial por encima de la termoclina). Y desde la termoclina hacia el sedimento se observó una marcada disminución de la concentración. A partir de marzo, donde comenzó la mezcla parcial, la concentración de los pigmentos fue similar en toda la profundidad de la columna de agua, disminuyendo hacia el fondo del lago. Las concentraciones máximas de clorofila *a* por extracción se obtuvieron en las muestras de superficie de los meses de marzo ($139 \mu\text{g L}^{-1}$) y abril ($216 \mu\text{g L}^{-1}$), correspondiente al período de mezcla parcial.

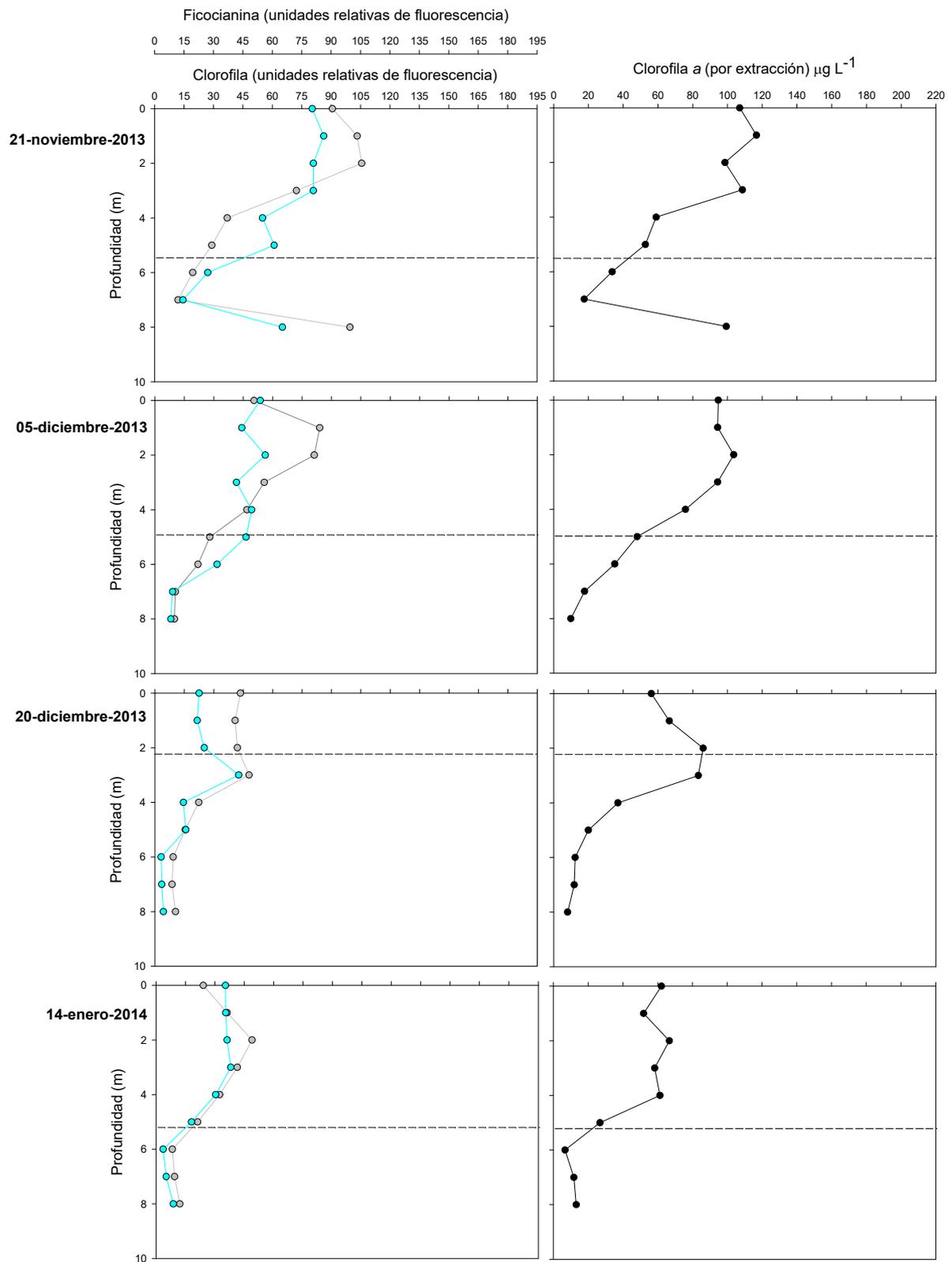


Figura 3 a). Comportamiento vertical de los pigmentos clorofila *a* *in vivo* (puntos grises), ficocianina *in vivo* (puntos celestes) y clorofila *a* por extracción (puntos negros). En líneas espaciadas negras se muestra la profundidad de la termoclina. Muestréos desde el 21/11/2013 al 14/01/2014.

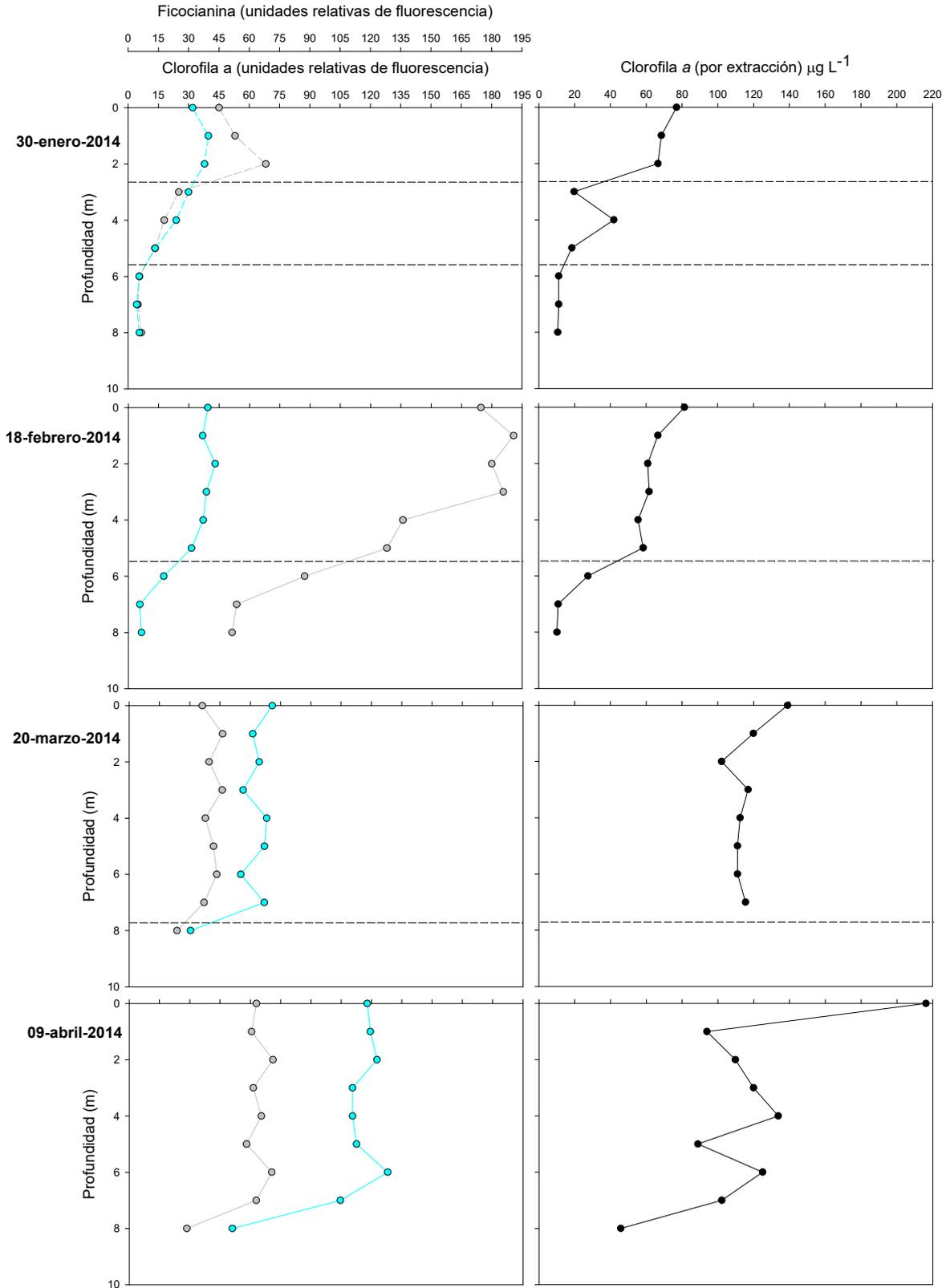


Figura 3 b). Muestrros correspondientes a las fechas del 30/01/2014 al 09/04/2014.

Con respecto a las correlaciones lineales (Fig. 4), los pigmentos indicadores de biomasa mostraron fuertes correlaciones durante el período de estratificación térmica. Se obtuvieron valores de r^2 entre 0,747 - 0,947 para la ficocianina *in vivo* y entre 0,800 – 0,927 para la clorofila *a in vivo*. Esto indicó proporcionalidad entre los estimadores generales del fitoplancton (clorofila *a* por fluorescencia y clorofila *a* por extracción) y el estimador de cianobacterias en particular (fluorescencia de ficocianina). En el período de mezcla parcial la correlación obtenida entre estos pigmentos no fue tan marcada, observándose menores ajustes tanto para la ficocianina *in vivo* (r^2 0,121 y 0,333) como para la clorofila *a in vivo* (r^2 0,05 y 0,324, meses de marzo y abril, respectivamente).

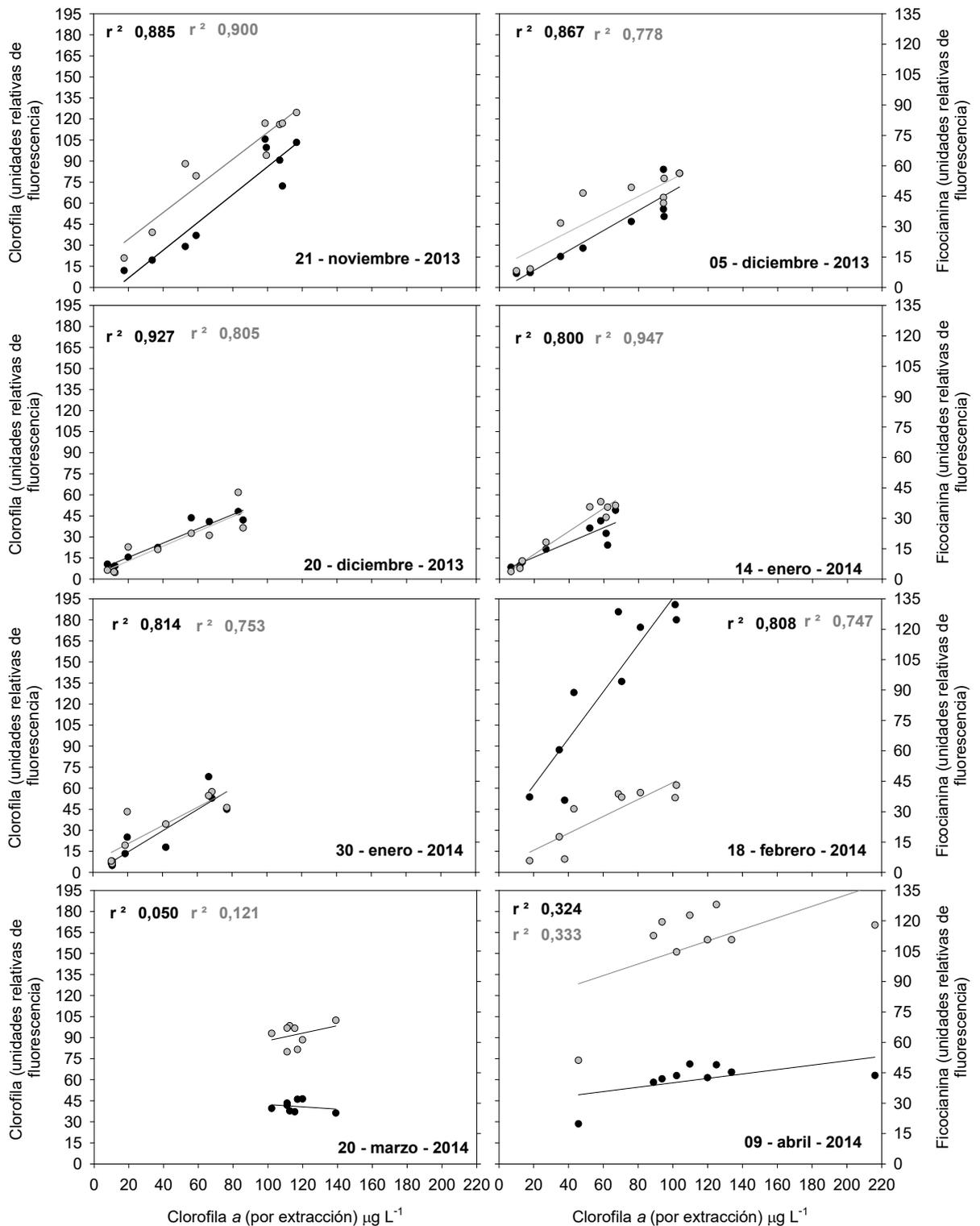


Figura 4. Correlaciones lineales entre fluorescencia *in vivo* de clorofila *a* (puntos negros) y ficocianina (puntos grises) vs. clorofila *a* por extracción.

6.5 Estructura de las comunidades fitoplanctónicas

El recuento de organismos presentes en las muestras integradas mostró la presencia de 5 grupos taxonómicos fitoplanctónicos diferentes, distribuidos en Cyanobacteria, Dinophyceae, Bacillariophyceae, Chlorophyceae y Euglenophyceae. El grupo taxonómico Cyanobacteria estuvo presente durante todo el período de estudio. A su vez, las cianobacterias filamentosas *Cylindrospermopsis raciborskii* (Orden Nostocales), *Planktothrix agardhii* (Orden Oscillatorial) y *Aphanizomenon sp.* (Orden Nostocales) fueron los organismos con mayor abundancia en los 8 muestreos realizados (datos no mostrados). El género *Aphanizomenon sp.*, no estuvo presente en el muestreo correspondiente al mes de marzo (Tabla 2).

Tabla 2. Presencia (x) de especies y géneros en cada muestreo realizado.

Especie	Grupo taxonómico (Orden)	Muestreos							
		21/11 /13	05/12 /13	20/12 /13	14/01 /14	30/01 /14	18/02 /14	20/03 /14	09/04 /14
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Cyanobacteria (Nostocales)	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Planktothrix agardhii</i>	Cyanobacteria (Oscillatorial)	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Aphanizomenon sp.</i>	Cyanobacteria (Nostocales)	X	X	X	X	X	X		X
<i>Microcystis sp.</i>	Cyanobacteria (Chroococcales)							X	
<i>Ceratium sp.</i>	Dinophyceae	X	X			X	X	X	
<i>Diatomea sp.</i>	Bacillariophyceae	X							
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	Chlorophyceae	X	X	X	X				
<i>Euglena sp.</i>	Euglenophyceae	X							
<i>Merismopedia sp.</i>	Cyanobacteria (Chroococcales)					X	X	X	X
<i>Scenedesmus sp.</i>	Chlorophyceae							X	

El cociente ficocianina/clorofila (Fig. 5) mostró mayores valores cuando los nutrientes estuvieron disponibles en la columna de agua durante la mezcla parcial (meses de marzo y abril). Tanto para la superficie como para el fondo del lago. Indicando mayor contribución de cianobacterias a la biomasa fitoplanctónica durante el período de mezcla parcial. En contraposición, el valor mínimo del cociente ficocianina/clorofila se registró al final del período de estratificación. La concentración de la clorofila *a* por extracción varió de 56 a 216 $\mu\text{g L}^{-1}$ en la superficie y de 8 a 115 $\mu\text{g L}^{-1}$ en el fondo.

Los biovolumenes de las 3 especies de cianobacterias más abundantes (Fig. 6) mostraron variaciones durante el período de estudio. Durante el inicio de la estratificación *Aphanizomenon sp.* fue la especie dominante en el mes de noviembre con una biomasa de 15,4 $\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$ y *Planktothrix agardhii* dominó la biomasa en diciembre. En enero y hacia fines de la estratificación térmica (febrero) se pudo observar la dominancia de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Luego, en el mes de marzo, el comienzo de la mezcla favoreció la biomasa de *Planktothrix agardhii*, la cual llegó a su valor máximo en el período muestreado (40,2 $\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$). Una vez estabilizada la columna (abril), volvió a dominar *C. raciborskii* con una biomasa de 30,0 $\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$.

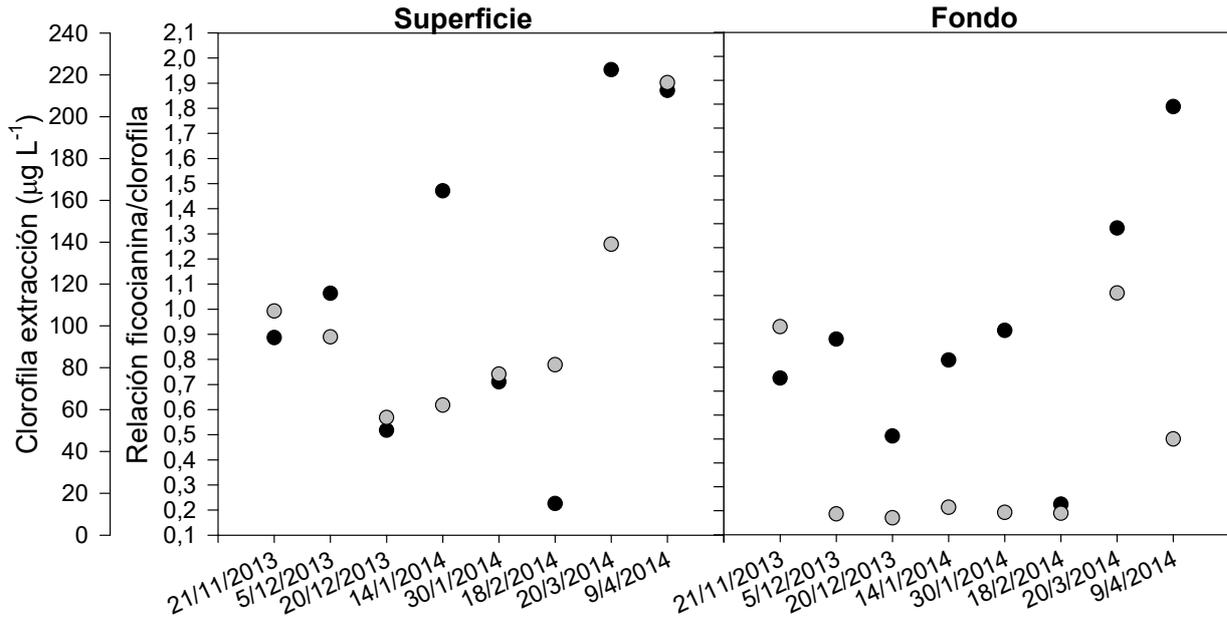


Figura 5. Diferencia entre pigmentos indicadores de biomasa en superficie y fondo durante el periodo de muestreo. En **negro**: cociente ficocianina/clorofila por fluorescencia, en **gris**: clorofila a por extracción.

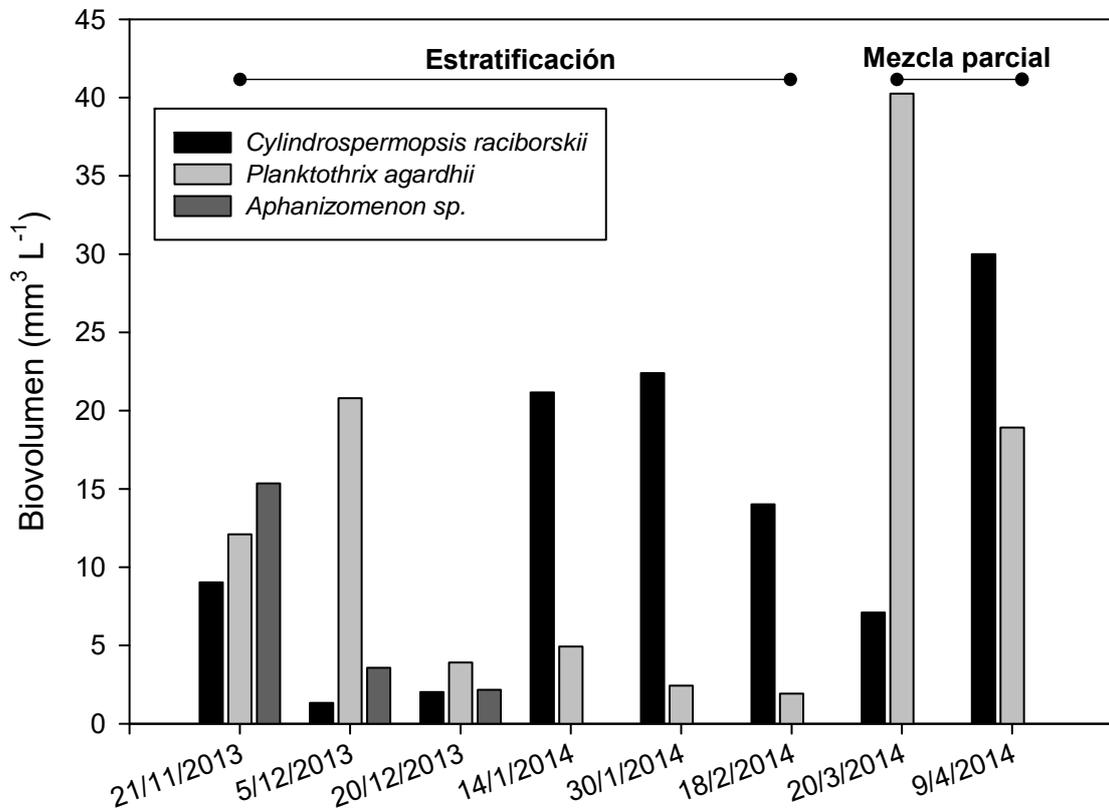


Figura 6. Biovolumen de las especies fitoplanctónicas con mayor biomasa durante los muestreos.

El análisis de varianza (ANAVA) no mostró diferencias estadísticas significativas entre los biovolúmenes en el estado estratificado (enero) y el estado de mezcla parcial (marzo). Tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar los pigmentos indicadores de biomasa en la superficie y en el fondo durante el mes de enero (estratificación) y marzo (mezcla). Datos no mostrados.

6.6 Cuantificación de nutrientes

El PO_4^{3-} y NH_4^+ fueron mínimos y no detectables en la zona epilimnética (Fig. 7). A partir de la termoclina y hacia el sedimento aumenta la disponibilidad de estos nutrientes, donde el OD tiende a cero y la materia orgánica en descomposición aumenta. En el mes de enero se obtuvieron las máximas concentraciones de ambos nutrientes, con valores en el fondo del lago que alcanzaron los $209 \mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P L}^{-1}$ y $1744 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$. En el mes de febrero se registraron las menores concentraciones para ambos nutrientes en toda la columna de agua.

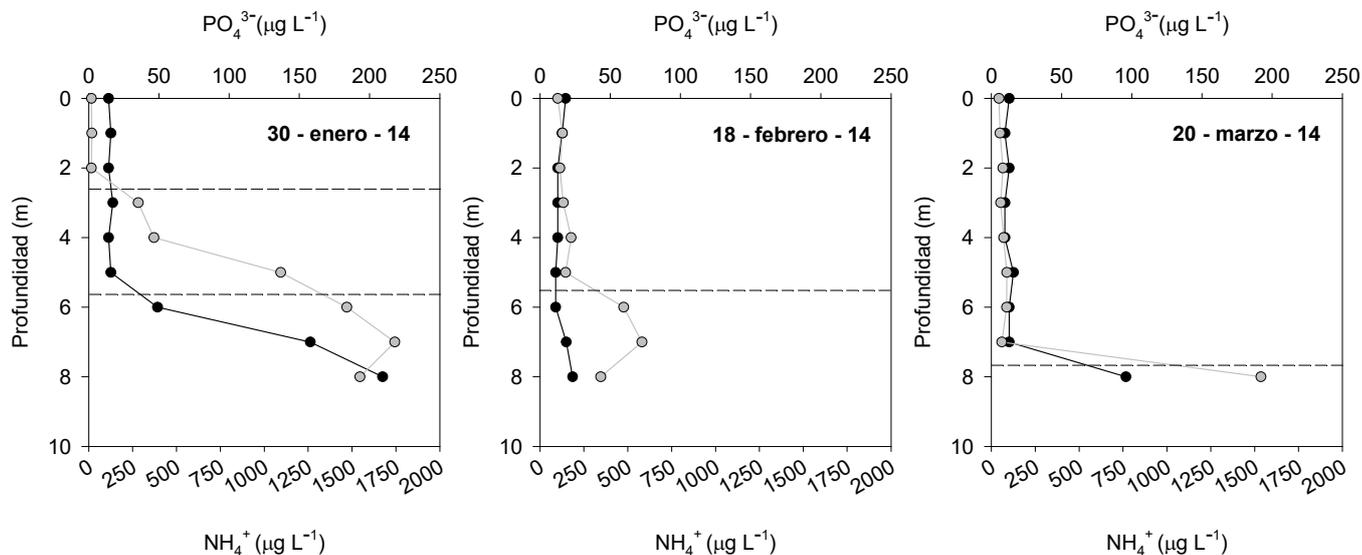


Figura 7. Variación de PO_4^{3-} (puntos negros) y NH_4^+ (puntos grises) en los meses de mayor temperatura (enero, febrero y marzo). Las líneas espaciadas indican la profundidad de la termoclina.

La relación entre los nutrientes disponibles en la columna de agua y la biomasa fitoplanctónica presente a través de los indicadores de *fluorescencia in vivo* (clorofila *a* y ficocianina) y clorofila *a* por extracción, mostraron tendencias negativas (Fig. 8). Estos pigmentos presentaron un comportamiento similar de enero a marzo, indicando la menor disponibilidad de nutrientes disueltos a mayores concentraciones de pigmentos. A su vez, las correlaciones significativas (con valores $p \leq 0.05$) y negativas encontradas entre dichos pigmentos con el NH_4^+ y el PO_4^{3-} , confirman las tendencias inversamente proporcionales existentes entre ellos (Tabla 3). Exceptuando el mes de marzo, donde sólo se observaron relaciones significativas entre la clorofila *a* por extracción y el NH_4^+ .

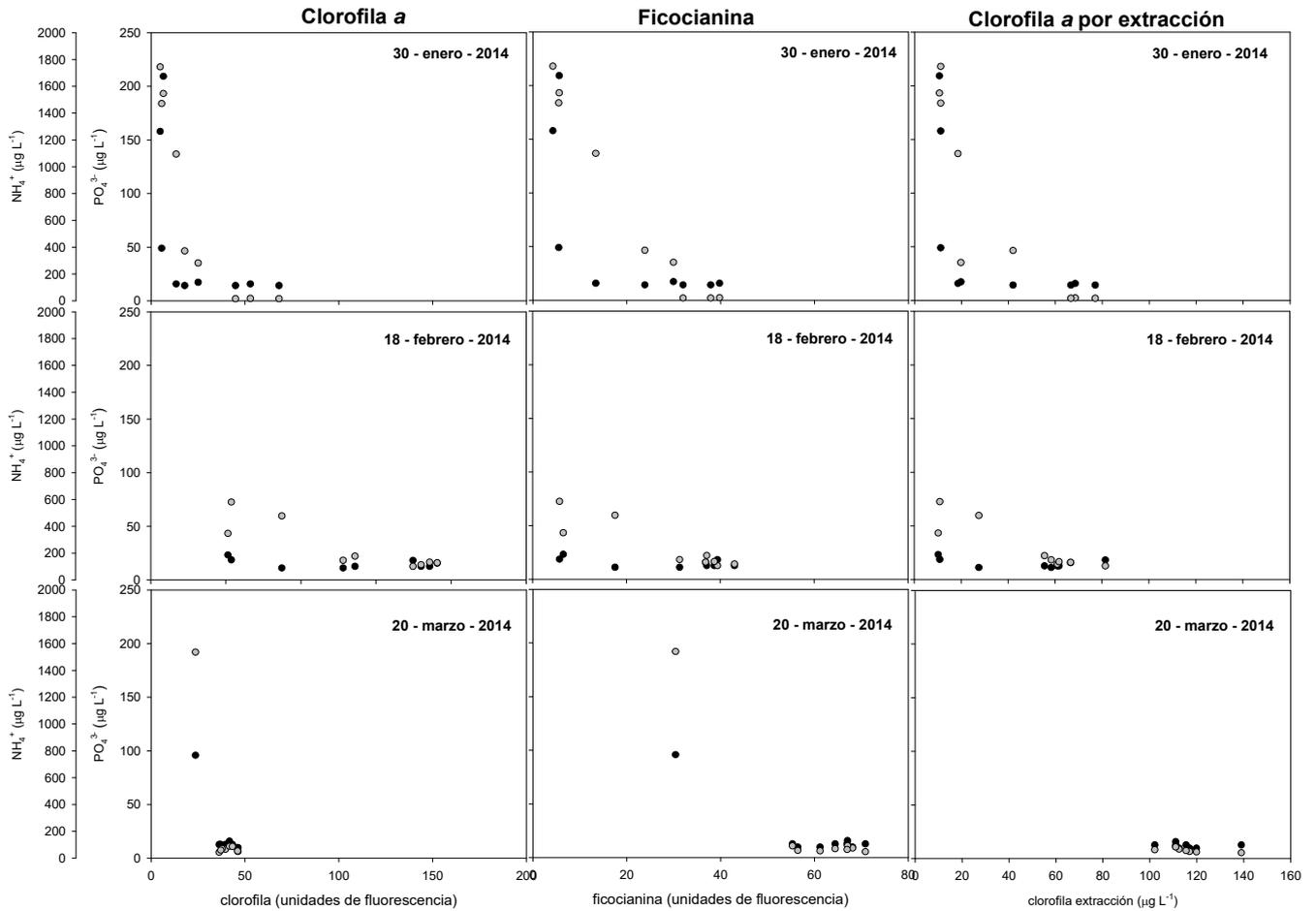


Figura 8. Relaciones entre los pigmentos indicadores de biomasa y nutrientes inorgánicos disueltos en los meses de mayor temperatura (enero, febrero y marzo). Los puntos negros indican la relación del pigmento con PO_4^{3-} . Puntos grises: relación del pigmento con el NH_4^+

Tabla 3. Matriz de coeficientes de valores de Spearman para: NH_4^+ , PO_4^{3-} , fluorescencia de clorofila *a in vivo* (Clo), fluorescencia de ficocianina *in vivo* (Fico) y clorofila *a* por extracción (Clo ext.). En las celdas de color gris se muestran los coeficientes de correlación y en blanco los valores p.

	30 - enero - 2014				18 - febrero - 2014				20 - marzo - 2014			
	Fico	Clo ext.	PO_4^{3-}	NH_4^+	Fico	Clo ext.	PO_4^{3-}	NH_4^+	Fico	Clo ext.	PO_4^{3-}	NH_4^+
Clo	0,983	0,862	-0,749	-0,933	0,767	0,883	-0,230	-0,783	-0,250	-0,060	-0,576	-0,233
	0,000	0,000	0,016	0,000	0,012	0,000	0,520	0,009	0,491	0,839	0,087	0,520
Fico		0,879	-0,707	-0,917		0,783	-0,247	-0,883		0,228	-0,160	-0,383
		0,000	0,030	0,000		0,009	0,491	0,000		0,537	0,643	0,285
Clo ext.			-0,863	-0,937			-0,153	-0,900			-0,453	-0,850
			0,000	0,000			0,676	0,000			0,233	0,002

6.7 Reserva en gránulos de polifosfato

El contraste de imágenes desde la superficie al fondo de la columna de agua para los muestreos de enero y marzo, evidenciaron diferencias en la intensidad de fluorescencia de los organismos presentes (Fig. 9). Si bien no se cuantificaron los gránulos de polifosfato presentes en la comunidad de cianobacterias, se observó que la acumulación de dichos gránulos en los filamentos aumentó con la profundidad del lago (mayor intensidad de fluorescencia). En el mes de marzo (Fig. 9, derecha) cuando la concentración soluble de PO_4^{3-} fue casi indetectable hasta el fondo del lago, se observó gran intensidad de señal en todas las profundidades muestreadas. Indicando que el PO_4^{3-} fue almacenado en forma de gránulos en los filamentos. En el mes de enero (Fig. 9, izquierda) se observó intensidad de fluorescencia (reserva de polisfosfatos) en los filamentos hasta los 5 metros de profundidad. A partir de los 6 metros (profundidad de la segunda termoclina aproximadamente) se observaron bacterias planctónicas heterótrofas, indicando la descomposición de los filamentos. A partir de las características morfológicas de los filamentos (forma y tamaño de los tricomas) y la presencia de heterocitos cónicos apicales, se estableció la presencia de *C. raciborskii* en la mayoría de las profundidades (Bonilla, 2009). También se identificaron otras cianobacterias como *P. agardhii*, *Aphanizomenon* sp. y *Merismopedia* sp. No se obtuvieron datos para la profundidad de 1 y 8 metros en el mes de marzo.

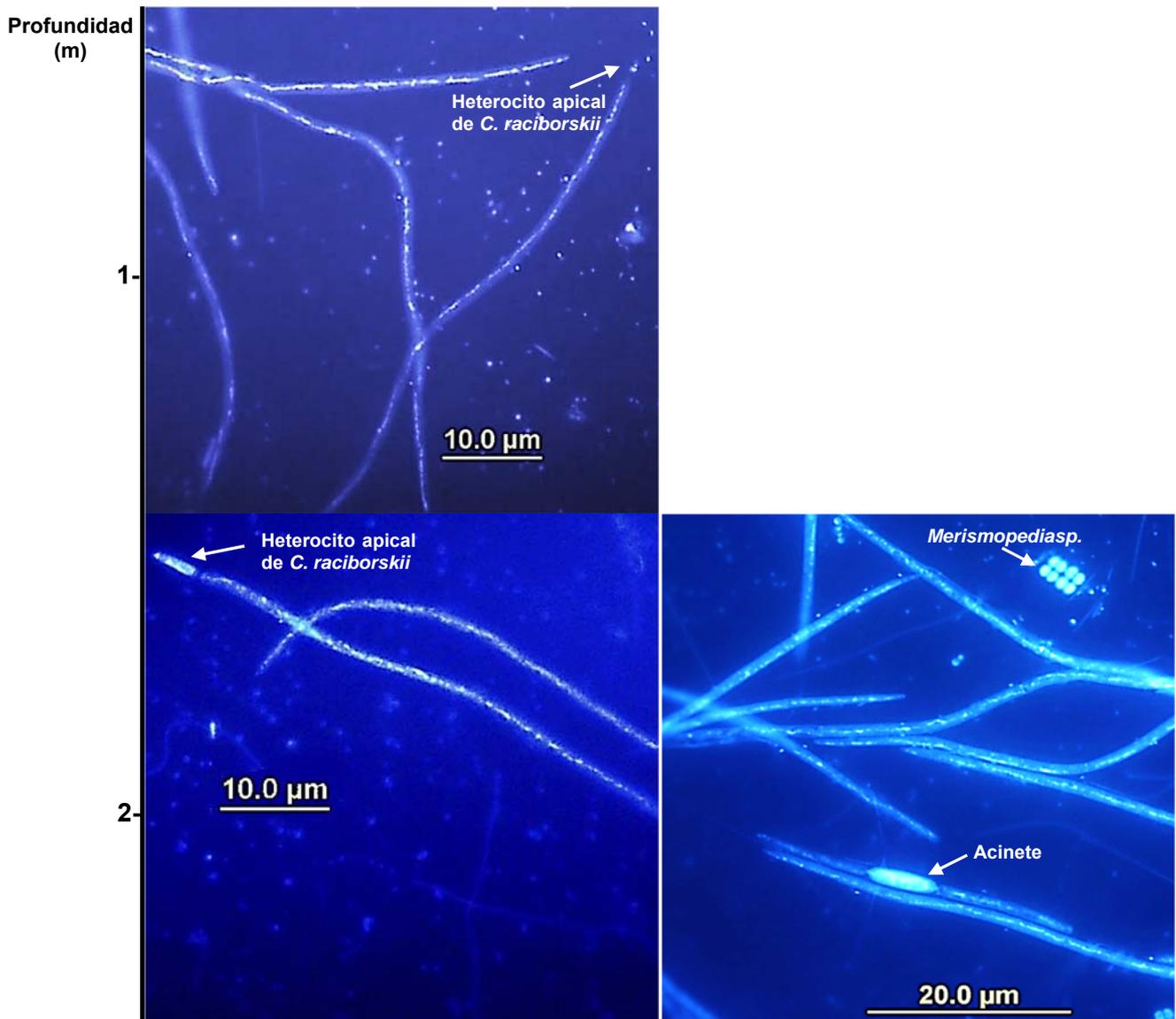


Figura 9 a). Fluorescencia del complejo DAPI-polifosfato. Imágenes cualitativas de la acumulación de polifosfatos intracelular en función de la profundidad del lago. Objetivo 40X. Izquierda: imágenes obtenidas para la fecha 30 de enero de 2014. Derecha: imágenes correspondientes a la fecha 20 de marzo de 2014. En la figura se muestran las imágenes correspondientes a 1 y 2 metros de profundidad.

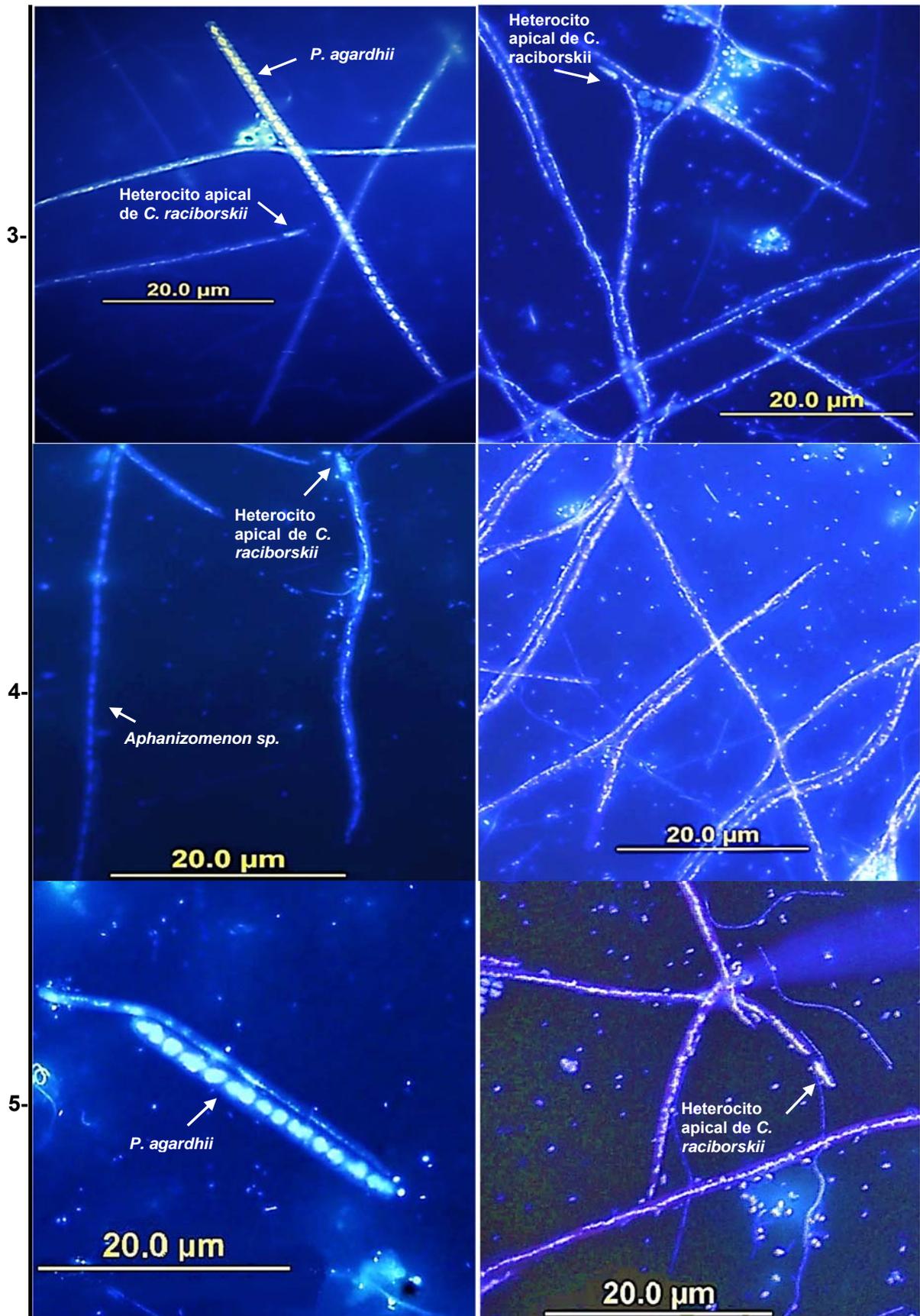


Figura 9 b) Profundidad del lago: 3 a 5 metros.

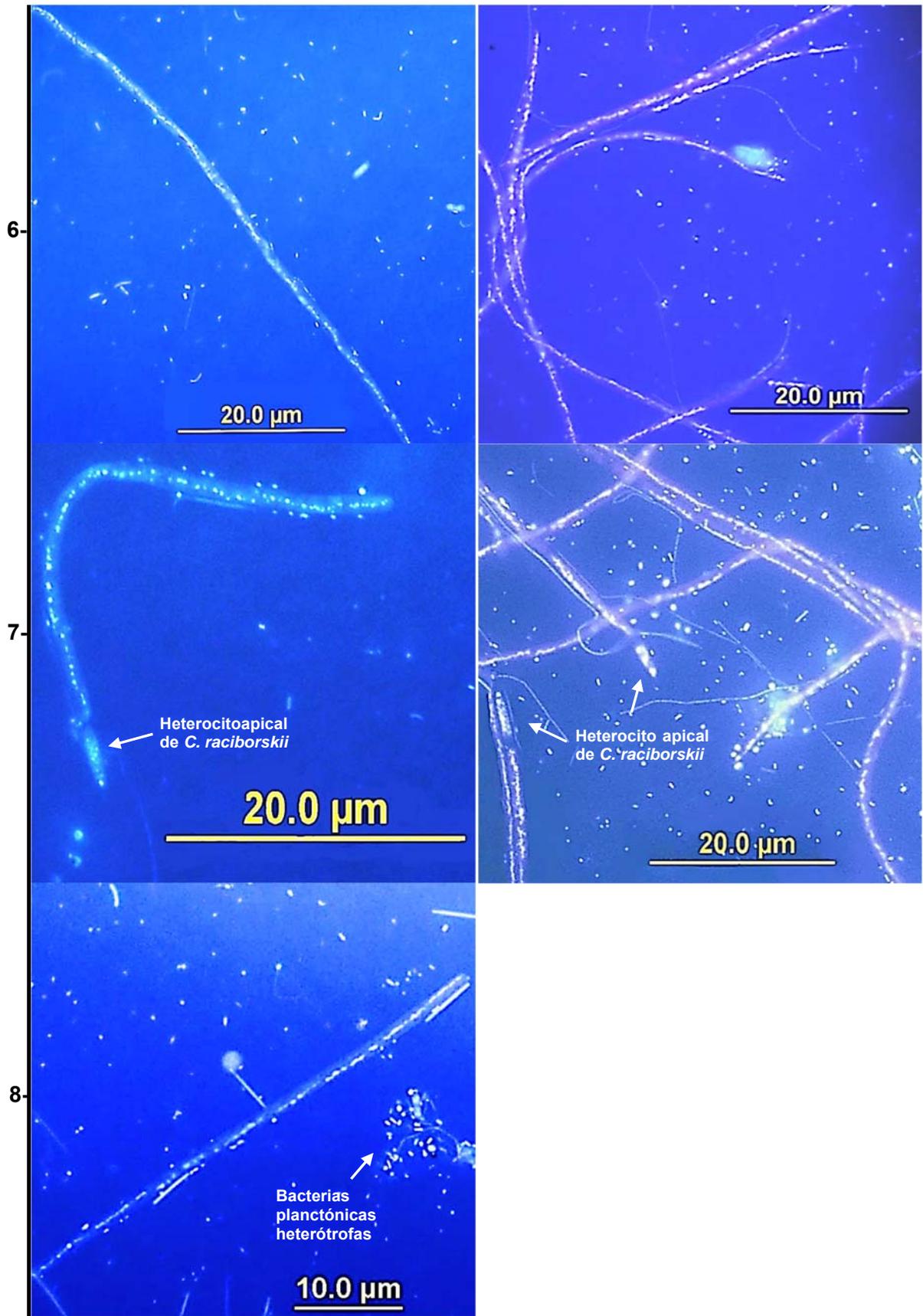


Figura 9 c) Profundidad del lago: 6 a 8 metros.

7. Discusión

7.1 Comportamiento de las variables fisicoquímicas

Las precipitaciones máximas registradas y los eventos de viento afectaron los muestreos de enero y febrero, contribuyendo seguramente en la mezcla y enfriamiento del lago. Estos eventos se evidenciaron en el muestreo de fines de enero 2014 (Fig. 2), donde se observa la presencia de dos termoclinas a los 2.6 m y 5.6 m de profundidad en el perfil vertical de temperatura. Además, la oxigenación del fondo del lago en el perfil de OD, afirma una gran mezcla vertical que coincide con los eventos de tormentas registrados en días anteriores. La relación entre las zonas eufóticas y de mezcla (Z_{eu}/Z_m) siempre fue menor a 1, por lo tanto la luz que reciben los organismos de la columna de agua es fluctuante e incluye períodos de oscuridad (Reynolds, 1994). Característico de sistemas turbios y eutróficos con estratificación térmica como el Lago Javier (Somma *et al.*, 2013). El aumento y disponibilidad de OD en el epilimnion (capa superficial por encima de la termoclina) en el período de estratificación térmica indica la acumulación de organismos fotosintéticos. Mientras que, las condiciones de anoxia que se evidencian a partir de la termoclina (hipolimnion) propician procesos de oxidación de la materia orgánica, desnitrificación, amonificación y liberación de PO_4^{3-} desde el sedimento. Estas condiciones favorecen la presencia de *C. raciborskii* y también de *P. agardhii*, puesto que poseen rasgos fenotípicos similares con gran capacidad de almacenamiento de PO_4^{3-} , regulación de la flotación, tolerancia a la mezcla continua y tolerancia a la sombra

(Reynolds, 1993; Istvánovics *et al.*, 2000; Padisák, 2003; Bonilla *et al.*, 2012).

El índice Z_{eu}/Z_{me} es un indicador de la luz promedio que reciben los organismos, a la vez que está condicionado por la morfometría del sistema (Padisák, 1997). El hecho de que este índice fuera menor a 1 durante todo el período estudiado ($Z_{eu}/Z_{me} < 1$), favoreció la presencia y crecimiento de cianobacterias con vesículas de gas, formadoras de floraciones dispersivas, durante la estratificación y mezcla de la columna de agua (Bonilla *et al.*, 2012; Somma, 2014). Sin embargo, la correlación entre los pigmentos estimadores de biomasa con los biovolúmenes de las cianobacterias identificadas en los muestreos fue variado. El pigmento clorofila *a* por fluorescencia no mostró correlación con *C. raciborskii*, *P. agardhii* ni *Aphanizomenon sp.* El trabajo realizado por Somma (2014) en este mismo lago de estudio, cuestionó el uso de la clorofila *a* por fluorescencia como estimador de biomasa fitoplanctónica en ambientes eutróficos dominados por cianobacterias. Puesto que, no es un buen indicador cuando los valores de clorofila *a* superan los $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (en este trabajo se reportaron valores de hasta $216 \mu\text{g L}^{-1}$). Si bien la clorofila *a* por extracción estuvo correlacionada con el biovolumen de *P. agardhii* en la superficie, también se ha cuestionado el uso de este pigmento puesto que tampoco sería un buen estimador de biovolumen en condiciones de altas biomásas (Bonilla *et al.*, 2012). No obstante, la correlación positiva encontrada entre la ficocianina por fluorescencia de superficie y fondo y el biovolumen de *P. agardhii* estaría indicando que este pigmento es el

mejor estimador de la biomasa de cianobacterias. Por lo tanto, este trabajo estaría en concordancia con los resultados obtenidos por Somma (2014). Sin embargo, la ficocianina por fluorescencia no tuvo correlación con el biovolumen de *C. raciborskii* ni con el de *Aphanizomenon sp.* Esto se podría deber a que se utilizaron muestras integradas de superficie a fondo para el cálculo de biovolumen. En la actualidad, se está estudiando en el Laboratorio de Limnología el uso de la ficocianina *in vivo* como indicador directo de la biomasa de cianobacterias (Bruno Cremella com. pers).

La relación inversamente proporcional entre la profundidad del Disco de Secchi y el biovolumen de *C. raciborskii* demuestra que la transparencia de la columna de agua es afectada por la alta biomasa de esta especie. Además, la correlación observada entre el biovolumen de *C. raciborskii* y *Aphanizomenon sp.* y de cada especie con el biovolumen de cianobacterias total, parecería indicar que la presencia de la primera especie en la columna de agua, influye negativamente sobre la segunda.

7.2 Indicadores de cianobacterias

Los indicadores globales de biomasa mostraron la distribución vertical del fitoplancton en función de la profundidad del lago. Específicamente, la ficocianina *in vivo*, permitió demostrar la presencia de cianobacterias capaces de regular su posición en la columna de agua,

como es el caso de las cianobacterias *C. raciborskii* y *P. agardhii* (Padisák, 2003). La concentración de biomasa de cianobacterias observadas en el epilimnion durante la estratificación térmica (Fig. 3 a y b), corrobora el aumento y disponibilidad de oxígeno observado en los perfiles verticales de las variables abióticas (Fig. 2). Puesto que, se trata de organismos que aprovechan la luz disponible para realizar fotosíntesis.

Si bien en este trabajo se analizaron muestras integradas del lago, los resultados de biovolumen (Fig. 6), corroboran la dominancia de *C. raciborskii* en los meses de mayor estratificación térmica (enero a marzo). Sin embargo, se determinó la presencia de *C. raciborskii* en altas biomásas durante todo el periodo de estudio, inclusive en los meses que dominó *P. agardhii* y *Aphanizomenon sp.* Lo que sugiere que esta especie posee alta capacidad de co-existir con otras especies (Bonilla *et al.*, 2012). A su vez, la adaptación de *C. raciborskii* a la variación de los distintos fenómenos ambientales como la temperatura, disponibilidad de luz y tolerancia a la mezcla (muestreo de abril), apoyan la hipótesis de su plasticidad fenotípica (Bonilla *et al.*, 2012).

Planktothrix agardhii dominó durante el comienzo de la estratificación (diciembre) y el comienzo de la mezcla (marzo). Esto condice con el hecho de que esta especie se favorece con la disminución de penetración de la luz y con la mezcla, autoperpetuando su alta biomasa y permanencia. Tal es el caso del Lago Rodó, donde *P. agardhii* domina el fitoplancton con temperaturas de 10 a 31 °C (Scasso *et al.*,

2001; Aubriot *et al.*, 2011). Además refuerza la idea de mostrar mayor competitividad en condiciones de baja luz, en comparación a *C. raciborskii*. (Bonilla *et al.*, 2012). En cambio *Aphanizomenon sp.* se vio favorecida durante el comienzo de la estratificación térmica, sobre todo en el mes de noviembre, donde la profundidad de la zona de mezcla es de 5.8 m. Este comportamiento es esperado para este tipo de cianobacterias que se concentran en un rango estrecho de profundidad por encima de la termoclina (cianobacterias epilimnias), presentes en ambientes eutróficos urbanos con estratificación estacional (Bonilla, 2009).

7.3 Estado fisiológico y reserva en gránulos de polifosfato

Las diferencias encontradas en el cociente ficocianina/clorofila (Fig. 5) pueden evidenciar cambios en la dominancia de procariontas a eucariotas. Sin embargo, dada la dominancia en biovolumen por cianobacterias (Fig. 6), este cociente sugiere los cambios en el estado fisiológico de éstas, particularmente un aumento de la deficiencia por nutrientes al final del período de estratificación (Bonilla, 2009; Bonilla *et al.*, 2015).

En los tres meses estudiados, tanto el comportamiento vertical de los nutrientes PO_4^{3-} y NH_4^+ (Fig. 7) como su relación con los pigmentos indicadores de cianobacterias (Fig. 8), sugieren el consumo de los mismos hasta valores casi indetectables, que favorecieron de forma

distinta a la biomasa de *C. raciborskii* y *P. agardhii*. Indicando la influencia directa de la disponibilidad de nutrientes disueltos sobre el crecimiento de estas cianobacterias presentes.

En las fechas de enero y febrero hubo dominancia de *Cyldropermopsis raciborskii*, luego, en el mes de marzo, donde el comienzo de la mezcla seguramente provocó el aumento de la disponibilidad de nutrientes en la columna de agua, *Planktothrix agardhii* se vio favorecida y fue la especie dominante. Este hecho se relaciona con la idea de que esta especie parece dominar el fitoplancton en condiciones más eutróficas que *C. raciborski* (Bonilla *et al.*, 2012; Dolman *et al.*, 2012). A su vez, que *P. agardhii* depende de que el PO_4^{3-} esté disponible en forma frecuente y no con pequeños pulsos de PO_4^{3-} como *C. raciborskii* (Aubriot *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2014).

Varios estudios mostraron las ventajas adaptativas de *C. raciborskii* respecto a la alta afinidad por el PO_4^{3-} , gran optimización en la incorporación, almacenamiento en gránulos de polifosfato, y eficiencia en su utilización respondiendo rápidamente a los aportes puntuales del nutriente (Istvánovics *et al.*, 2000; Martigani, 2012; Amaral *et al.*, 2014). En este trabajo, se observó la presencia de gránulos de polisfosfato intracelular en filamentos de *C. raciborskii* durante los meses de mayor deficiencia de nutrientes disueltos (enero y marzo). Y un aumento en la densidad de filamentos en marzo (Fig. 9). Por lo tanto, esto indicaría que la especie incorpora el PO_4^{3-} liberado desde el sedimento del lago (hipolimnion), permitiéndole mantener biomásas elevadas en condiciones

limitantes de nutrientes. Los eventos de tormentas y mezcla en ambos meses seguramente influyeron en un flujo vertical ascendente del nutriente desde el hipolimnion. Si bien en el mes de marzo no dominó *C. raciborskii*, mantuvo una biomasa elevada. La presencia de heterocitos apicales, en estas condiciones de NH_4^+ soluble indetectable, podría estar indicando la fijación de N atmosférico. Lo que demuestra otra ventaja adaptativa de *C. raciborskii* frente cianobacterias como *Planktothrix agardhii*. Sin embargo, Fabre *et al.* (2010) establecieron que la presencia de *C. raciborskii* en lagos como el Javier, no estaría relacionada con la deficiencia por N. Puesto que la especie tiene la capacidad de regular su flotabilidad para acceder al NH_4^+ que se libera desde el sedimento. Por lo tanto, la eficiencia en la captación de estos nutrientes (P y N) favorecen la dominancia y permanencia de *C. raciborskii* (Padisák, 1997; Fabre, 2011)

8. Conclusiones y perspectivas

Se observó la formación de gránulos de polifosfato y aumento de la densidad de los mismos en el período de mayor deficiencia de PO_4^{3-} soluble, como consecuencia al aporte de dicho nutriente desde el hipolimnion. Con el subsiguiente aumento de filamentos de *C. raciborskii* y dominancia de la misma en los meses de enero y febrero. Si bien *C. raciborskii* no fue la especie dominante durante todos muestreos, su capacidad de co-existir con otras especies de cianobacterias y su gran plasticidad fenotípica en respuesta a factores ambientales clave como

condiciones fluctuantes de luz, temperatura, mezcla y disponibilidad de nutrientes, le permite adaptarse y ser exitosa en toda la profundidad de la columna de agua (Aubriot *et al.*, 2011; Bonilla *et al.*, 2012). Estos resultados apoyan la hipótesis planteada en ese trabajo.

La dominancia y permanencia de *Cylindrospermopsis raciborskii* en el lago, así como también de otras cianobacterias formadoras de floraciones dispersivas como *Planktothrix agardhii*, se ven sustentadas por cargas hipolimnéticas de PO_4^{3-} . Puesto que los reportes de floraciones de cianobacterias en sistemas lénticos son cada vez más frecuentes en Uruguay (Bonilla *et al.*, 2012), este trabajo muestra la capacidad de estas cianobacterias de soportar condiciones de estrés nutricional por períodos prolongados. Lo que desafía los intentos de mitigación de las floraciones nocivas. Por lo tanto, es fundamental trabajar en la reducción significativa de la carga de nutrientes a la hora de recuperar ecosistemas afectados por floraciones de cianobacterias.

9. Referencias

- AMARAL, V. 2011. Flexibilidad fenotípica de la cianobacteria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* a las fluctuaciones en la disponibilidad de fosfato. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad de la República, Uruguay.
- AMARAL, V., BONILLA, S. & AUBRIOT, L. 2014. Growth optimization of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in response to phosphate fluctuations. *European Journal of Phycology*, 49, 134-141.
- ASCHAR-SOBBI, R., ABRAMOV, A., DIAO, C., KARGACIN, M., KARGACIN, G., FRENCH, R. & PAVLOV, E. 2008. High Sensitivity, Quantitative Measurements of Polyphosphate Using a New DAPI-Based Approach. *Journal of Fluorescence*, 18, 859-866.
- AUBRIOT, L. 2008. Flexibilidad de la cinética de incorporación de fosfato por fitoplancton a las fluctuaciones en el suministro del nutriente. Tesis de Doctorado, PEDECIBA. Universidad de la República, Uruguay.
- AUBRIOT, L. & BONILLA, S. 2012. Rapid regulation of phosphate uptake in freshwater cyanobacterial blooms. *Aquatic Microbial Ecology*, 67, 251-263.
- AUBRIOT, L., BONILLA, S. & FALKNER, G. 2011. Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations. *Federation of European Microbiological Societies*, 77, 1-16.
- AUBRIOT, L., WAGNER, F. & FALKNER, G. 2000. The phosphate uptake behaviour of phytoplankton communities in eutrophic lakes reflects alterations in the phosphate supply. *European Journal of Phycology*, 35, 255-262.
- BAR-YOSEF, Y., SUKENIK, A., HADAS, O., VINER-MOZZINI, Y. & KAPLAN, A. 2010. Enslavement in the water body by toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, inducing alkaline phosphatase in phytoplanktons. *Current Biology*, 20, 1557-1561.
- BONILLA, S. 2009. Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de monitoreo. Montevideo, UNESCO.
- BONILLA, S., AUBRIOT, L., SOARES, M., GONZÁLEZ-PIANA, M., FABRE, A., HUSZAR, V., LÜRLING, M., ANTONIADES, D., PADISÁK, J. & KRUK, C. 2012. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *Federation of European Microbiological Societies*, 79, 594-607.
- BONILLA, S., HAAKONSSON, S., SOMMA, A., GRAVIER, A., BRITOS, A., VIDAL, L., DE LEÓN, L., BRENA, B., PÍREZ, M. & PICCINI, C. 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *INNOTECH*, 10, 9-22.
- BRIAND, J., LÉBOULANGER, C., HUMBERT, J., BERNARD, C. & DUFOUR, P. 2004. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria)

- invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology*, 40, 231-238.
- CAREY, C. C., IBELINGS, B. W., HOFFMANN, E. P., HAMILTON, D. P. AND BROOKES, J. D. 2012. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research* 46, 1394-1407.
- CHORUS, I. & BARTRAM, J. 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. London, Chapman & Hall.
- CREMELLA, B. 2014. Factores involucrados en la expansión de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* en el continente americano. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Universidad de la República, Uruguay.
- DIGNUM, M., MATTHIJS, H., PEL, R., LAANBROEK, H. & MUR, L. 2005. Nutrient limitation of freshwater Cyanobacteria. In: HUISMAN, J., MATTHIJS, H. & VISSER, P. (eds.) *Harmful Cyanobacteria*, 65-86.
- DOLMAN, A. M., RÜCKER, J., PICK, F. R., FASTNER, J., ROHRLACK, T., MISCHKE, U. & WEIDNER, C. 2012. Cyanobacteria and cyanotoxins: the influence of nitrogen versus phosphorus. *PLoS One* 7: e38757.
- FABRE, A. 2011. Flexibilidad fenotípica de la cianobacteria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* en un gradiente lumínico. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Universidad de la República, Uruguay.
- FABRE, A., CARBALLO, C., HERNÁNDEZ, E., PIRIZ, P., BERGAMINO, L., MELLO, L., GONZÁLEZ, S., PÉREZ, G., LEÓN, J. G., AUBRIOT, L., BONILLA, S. & KRUK, C. 2010. El nitrógeno y la relación zona eufótica/zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales, artificiales de Uruguay. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5, 112-125.
- FALKNER, G., FALKNER, R. & SCHWAB, A. 1989. Bioenergetic characterization of transient state phosphate uptake by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Archives of Microbiology*, 152, 353-361.
- FERBER, L., LEVINE, S., LINI, A. & LIVINGSTON, G. 2004. Do cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen? *Freshwater Biology*, 49, 690-708.
- GONZALEZ, N., VEGA, C., SARTHOU, F. & BOU, N. 2009. Cianobacterias y cianotoxinas: un estudio en la ciudad de la costa. Montevideo: Facultad de Ciencias, Universidad de la República- CSIC PAIE.
- HILLEBRAND, H., DÜRSELEN, C., KIRSCHTEL, D., ZOHARY, T. & POLLINGHER, U. 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35, 403-424.
- HUDSON, J., TAYLOR, W. & SCHINDLER, D. 2000. Phosphate concentrations in lakes. *Nature*, 406, 54 - 56.
- HUISMAN, J., MATTHIJS, H. & VISSER, P. 2005. Population dynamics of Harmful Cyanobacteria. Dordrecht, Springer.

- ISO-10260 1992. Water quality measurement of biochemical parameters spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration. Ginebra, International Organization for Standarization, 1-6.
- ISTVÁNOVICS, V., SHAFIK, H. M., PRÉSING, M. & JUHOS, S. 2000. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biology* 43, 257-275.
- IZAGUIRRE, G., HWANG C. J., KRASNER, S. W. & MCGUIRE, M. J. 1982. Geosmin and 2 - methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 708-14.
- KALFF, J. 2002 . *Limnology: inland water ecosystems*. Prentice-Hall New Jersey, 592pp.
- KASINAK, J., HOLT, B., CHISLOCK, M. & WILSON, A. 2014. Benchtop fluorometry of phycocyanin as a rapid approach for estimating cyanobacterial biovolume. *Journal of Plankton Research*, 0, 1-10
- KOROLEFF, F. 1970. Direct determination of ammonia in natural water as indophenol-blue. In: ICES, ed. *International Conference in the Exploration of the Sea. C.M. 1969/C9. Interlaboratory Reports. Information on techniques and methods for sea water analysis*, August 1970 Copenhagen. 19-22.
- KULAEV, I. & VAGABOV, V. 1983. Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, 24, 88-171.
- KULAKOVA, A. N., HOBBS, D., SMITHEN, M., PAVLOV, E., GILBERT, J. A., QUINN, J. P. & MCGRATH, J. W. 2011. Direct quantification of inorganic polyphosphate in microbial cells using 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Environmental Science and Technology*, 45, 7799-803.
- LEFLAIVE, J. & TEN-HAGE, L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology*, 52, 199-214.
- LEHMAN, P., TEH, S., BOYER, G., NOBRIGA, M., BASS, E. & HOGLE, C. 2010. Initial impacts of *Microcystis aeruginosa* blooms on the aquatic food web in the San Francisco Estuary. *Hydrobiologia*, 637, 229-248.
- LÜRLING, M., ESHETU, F., FAASSEN, E. J., KOSTEN, S. & HUSZAR, V. L. M. 2013. Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology*, 58, 552–559.
- MARTIGANI, F. 2012. Influencia de la deficiencia por nutrientes en el crecimiento y la producción de toxinas de una cianobacteria invasora. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad de la República, Uruguay.
- MEHNERT, G., LEUNERT, F., CIRÉS, S., JOHNK, K. D., RUCKER, J., NIXDORF, B. & WIEDNER, C. 2010. Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. *Journal of Plankton Research*, 32, 1009-1021.
- MESQUITA, D. P., AMARAL, A. L., LEAL, C., CARVALHEIRA, M., CUNHA, J. R., OEHMEN, A., REIS, M. A. & FERREIRA, E. C.

2014. Monitoring intracellular polyphosphate accumulation in enhanced biological phosphorus removal systems by quantitative image analysis. *Water Science Technology*, 69, 2315-23.
- MURPHY, J. & RILEY, J. P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemical Acta*, 27, 31-36.
- NUSCH, E. 1980. Comparisons of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie Ergebnisse der Limnologie*, 14, 14-36.
- OBRADOR, B., STAEHR, P. A. & CHRISTENSEN, J. P. 2014. Vertical patterns of metabolism in three contrasting stratified lakes. *Limnology and Oceanography*, 59, 1228-1240.
- OLIVER, R. & GANF, G. Freshwater blooms. In: *The Ecology of Cyanobacteria*. WHITON, B. & POTTS, M. Eds., Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 149-194.
- PADISÁK, J. 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv für Hydrobiologie Supplement*, 107, 563-593.
- PADISÁK, J. 2003. Phytoplankton. In: O'SULLIVAN, P. E. & REYNOLDS, C. S. (eds.) *The Lakes Handbook 1. Limnology and Limnetic Ecology*. Oxford: Blackwell Science Ltd. Oxford.
- PAERL, H. W. & HUISMAN, J. 2008. Blooms Like It Hot. *Science*, 320, 57-58.
- PICCINI, C., AUBRIOT, L., FABRE, A., AMARAL, V., GONZÁLEZ-PIANA, M., GIANI, A., FIGUEREDO, C. C., VIDAL, L., KRUK, C. & BONILLA, S. 2011. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae*, 10, 644-653.
- REDFIELD, A. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, 46, 205-222.
- REYNOLDS, C. S. 1993. Scales of disturbance and their importance in plankton ecology. *Hydrobiologia*, 249, 157 - 171.
- REYNOLDS, C. S. 1994. The long, the short and the stalled: on the attributes of phytoplankton selected by physical mixing in lakes and rivers. *Hydrobiologia*, 289, 9-21.
- REYNOLDS, C. S. 2006. *Ecology of phytoplankton*, Cambridge, Cambridge University Press, 550pp.
- RIGLER, F. H. 1956. A tracer study of the phosphorus cycle in lake water. *Ecology*, 37, 550-562.
- SCASSO, F., MAZZEO, N., GORGA, J., KRUK, C., LACEROT, G., CLEMENTE, J. & BONILLA, S. 2001. Limnological changes in a sub-tropical shallow hypertrophic lake during its resoration: two years of a whole-lake experiment. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 11, 31-44.
- SCHINDLER, D. W. 1977. Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science*, 195, 260-2.

- SCHINDLER, D. W. 2012. The dilemma of controlling cultural eutrophication of lakes. *Proceedings Biological Sciences*, 279, 4322-33.
- SINHA, R., PEARSON, L. A., DAVIS, T. W., BURFORD, M. A., ORR, P. T. & NEILAN, B. A. 2012. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones--is climate change responsible? *Water Research*, 46, 1408-19.
- SOMMA, A. 2014. El papel de la luz y la temperatura en la dinámica de cianobacterias en un lago de uso recreativo. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad de la República, Uruguay.
- SOMMA A., AUBRIOT L., HIRSCH F., MARTIGANI F., HAAKONSSON S., BRENA B., PÍREZ M., & BONILLA S. 2013. Informe sobre la calidad del agua del Lago Calcagno e implicancias para el uso recreativo. Informe destinado para los vecinos del Lago Calcagno, Canelones. Sección Limnología de Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
- UTERMÖHL, H. 1958. Zur Vervollkomnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie*, 9, 1-38.
- VANDERGUCHT, D. M., SEREDA, J. M., DAVIES, J. M. & HUDSON, J. J. 2013. A comparison of phosphorus deficiency indicators with steady state phosphate in lakes. *Water Research*, 47, 1816-26.
- VIDAL, L. & KRUK, C. 2008. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3, 142-151.
- WHITTON, B. & POTTS, M. 2000. *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 669pp.
- WOJCIECHOWSKI, J. 2013. Efeitos da Temperatura, Fósforo e Luz no crescimento da cianobactéria *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju do reservatório de Alagados, Paraná. Programa de PósGraduação em Botânica. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- WOLK, C. P., ERNST, A. & ELHAI, J. 1994. Heterocyst metabolism and development. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. D. A. Bryant (Ed.) New York, Kluwer Academic Publishers, 769-823.