

PEDECIBA- Maestría en Biología

Sub-área Ecología

Fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes como factor promotor de floraciones de cianobacterias tóxicas

Fátima Martigani Alonso

Defensa: 30/05/2017

Montevideo, Uruguay



Fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes como factor promotor de floraciones de cianobacterias tóxicas

Fátima Martigani Alonso (fmartigani@fcien.edu.uy)

Director de tesis:

Dr. Luis Aubriot (laubriot@fcien.edu.uy)

Co-directora de tesis:

Dra. Sylvia Bonilla (sbon@fcien.edu.uy)

Resumen

Las floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas son un fenómeno frecuente en ecosistemas acuáticos eutróficos. Recientemente se demostró que el crecimiento de las cianobacterias es afectado por la frecuencia en la disponibilidad de nutrientes (fluctuaciones o pulsos) y por el tiempo de exposición principalmente al fósforo. Al presente se desconocen los efectos que tienen estas fluctuaciones en el desarrollo y sobrevivencia de poblaciones de cianobacterias. El objetivo de esta tesis fue analizar el crecimiento de poblaciones de cianobacterias tóxicas florecedoras en comunidades naturales frente a patrones de pulsos de fósforo en combinación con condiciones contrastantes de disponibilidad de nitrógeno. Se caracterizó el fitoplancton de un lago eutrófico en tres etapas de estratificación estival. Se realizaron dos experimentos mediante incubaciones de agua del lago en los que se simulaban diferentes tiempos de exposición al fosfato: fluctuaciones cortas (un pulso), intermedias (un pulso por día) y extensas (un pulso cada 10 min) más un control sin adición de fósforo. Estos tratamientos se evaluaron con y sin adición de nitrato. Se determinó el biovolumen, el crecimiento específico de las cianobacterias predominantes y la producción de cianotoxinas. El fitoplancton estuvo dominado por las cianobacterias filamentosas *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Planktothrix agardhii*. La máxima tasa de crecimiento del fitoplancton total y de las especies dominantes de cianobacterias se registró en la condición de mayor exposición al P, independientemente de la disponibilidad de N. A su vez la concentración de toxinas por unidad de biovolumen de cianobacterias fue mayor en este tratamiento. *C. raciborskii* exhibió tasas de crecimiento positivas en la condición control. Los resultados obtenidos indican que las condiciones fluctuantes de fosfato promueven el crecimiento de cianobacterias florecedoras. Esta tesis contribuye al conocimiento del crecimiento y persistencia de cianobacterias tóxicas en condiciones de estrés nutricional natural o inducido en la recuperación de ambientes eutrofizados.

Abstract

Blooms of potentially toxic cyanobacteria are a common phenomenon in eutrophic aquatic ecosystems. It was recently shown that the growth of cyanobacteria is affected by the frequency of nutrient availability (fluctuations or pulses) and the time of exposure mainly to phosphorus. At present the effects of these fluctuations on the development and survival of cyanobacteria populations are unknown. The objective of this thesis was to analyze the growth of populations of toxic bloom forming cyanobacteria in natural communities versus phosphorus pulse patterns in combination with contrasting conditions of nitrogen availability. The phytoplankton of a eutrophic lake was characterized in three stages of summer stratification. Two experiments were performed using lake water incubations in which different times of exposure to phosphate were simulated: short (one pulse), intermediate (one pulse per day) and extensive (one pulse every 10 min) plus one control without addition of phosphorus. These treatments were evaluated with and without addition of nitrate. The biovolume, the specific growth of the predominant cyanobacteria and the production of cyanotoxins were determined. Phytoplankton was dominated by the filamentous cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Planktothrix agardhii*. The maximum growth rate of total phytoplankton and dominant cyanobacterial species was recorded in the condition of greater exposure to P, regardless of the availability of N. In turn the concentration of toxins per unit of cyanobacteria biovolume was higher in this treatment. *C. raciborskii* exhibited positive growth rates in the control condition. The results indicate that fluctuating phosphate conditions promote the growth of bloom forming cyanobacteria. This thesis contributes to the knowledge of the growth and persistence of toxic cyanobacteria under conditions of natural or induced nutritional stress in the recovery of eutrophic environments.

Agradecimientos

A mi familia por el apoyo incondicional de siempre y por escucharme y alentarme en los momentos difíciles.

A Joaquín por su apoyo, por sus palabras, por sus abrazos, por su compañía en el desarrollo de los experimentos y por hacer que todos los días terminen con sonrisas.

A mis amigos, Caro, Pablo, Lula, Andrés, Dani, Laurita, Paula, Lu, Gabi, Lean, el Rulo, Geju, Seba, Renzo, esos amigos que siempre están para darte para adelante, que no te dejan bajar los brazos, y que siempre estuvieron para tomar alguna en momentos difíciles.

A mis tutores, Luis y Sylvia, por el apoyo en todos estos años. Fueron las personas que me formaron desde mis inicios en la ciencia, con mi tesina de grado y me siguen acompañando en este proceso. Siempre me han apoyado y me han ayudado a ser mejor profesional.

A los chicos del laboratorio: Ame, Carme, Andrea, Signe, Fede, Bruno, Nacho, Marianita, Nati, Manuel, Tati, Andrea por ser la mejor compañía para trabajar todos los días. Con ellos me he reído, he bailado, hemos dibujado, y la verdad que son los mejores compañeros que una persona puede tener. Gracias a todos por el aguante durante todo el desarrollo de esta Maestría.

A mis compañeros “grandes” del laboratorio: Rafa, Memo, Caracas, Daniel, Carla, el Abuelo. De todos ellos he aprendido mucho. Siempre apoyando y dando ánimo. Les agradezco los almuerzos, las charlas, los cafecitos y sobre todo la buena onda.

A mis compañeros de la Unidad, o como nos llamamos, “los unidandos”. Han sido de gran apoyo ayudándome en aquellos momentos que necesitaba tiempo para los experimentos y para escribir. Siempre con su buena onda y con su alegría.

A Maricarmen por sus aportes súper valiosos para mí en todo lo que se refiere a la taxonomía de cianobacterias. Siempre alegre y con la energía para explicarme todo lo que me generaba dudas.

A Celia Sant’Anna y a Andrea Tucci por haberme recibido en su laboratorio y haberme enseñado sobre taxonomía de cianobacterias. Ha sido un gran aporte para el desarrollo de este trabajo

A la ANII y a la CSIC por haber financiado este trabajo a través de sus programas de becas de Maestría.

Contenido

1. Introducción y Antecedentes:.....	7
1.1. Eutrofización en lagos y floraciones de cianobacterias.....	7
1.2. Producción de cianotoxinas	8
1.3. Factores físicos que afectan el crecimiento de cianobacterias	9
1.4. El papel de los nutrientes en el crecimiento de cianobacterias.....	11
1.5. El caso particular de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	14
1.6. Justificación del trabajo	14
2. Objetivos y Predicciones.....	15
2.1. Objetivos	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
2.3. Predicciones	15
3. Metodología y área de estudio	16
3.1. Estrategia metodológica	16
3.2. Área de estudio	16
3.3. Mediciones <i>in situ</i> y análisis de laboratorio.....	17
3.4. Experimentos con nutrientes.....	19
3.5. Análisis de datos.....	24
4. Resultados	26
4.1. Objetivo específico 1. <i>Evaluar la relación entre la disponibilidad de nutrientes y la estructura de la comunidad de fitoplancton del lago Javier en el período de estratificación de verano (temprana, media y tardía).</i>	26
4.2. Objetivo específico 2. <i>Analizar el efecto de diferentes t_E al fósforo y la disponibilidad de nitrato en la tasa de crecimiento de las especies dominantes de cianobacterias.</i>	32
4.3. Objetivo específico 3. <i>Analizar si el estado nutricional de las cianobacterias influye en la producción de toxinas: saxitoxinas (STX) y microcistinas (MYC).</i>	44
5. Discusión.....	48
5.1. Cianobacterias planctónicas en períodos de estratificación	49
5.2. Ventajas adaptativas de las cianobacterias frente a fluctuaciones de nutrientes.....	51
5.3. Síntesis de cianotoxinas.....	56
6. Conclusiones	59
7. Perspectivas.....	60
Bibliografía.....	60

1. Introducción y Antecedentes:

1.1. Eutrofización en lagos y floraciones de cianobacterias

El aumento del aporte de nutrientes a los ecosistemas acuáticos producto de las actividades antropogénicas se conoce como eutrofización cultural y es un problema ambiental global que genera pérdida de diversidad y perjuicios sociales y económicos (Smith, 2003; Reynolds, 2006; Paerl et al., 2016). Los ecosistemas límnicos Uruguay, tanto lénticos como lóticos, se han visto profundamente afectados por este proceso en los últimos años debido al incremento de las actividades industriales y agropecuarias en las respectivas cuencas (Rodríguez-Gallego, 2010; Bonilla et al., 2015). Una consecuencia directa de la eutrofización es el aumento de la producción primaria de fitoplancton, y en particular la ocurrencia de floraciones de cianobacterias, que consiste en un aumento abrupto de biomasa en un corto período de tiempo (Anderson et al., 2002; Reynolds, 2006). Este fenómeno puede darse de forma rápida, ya que la incorporación de nutrientes esenciales como nitrógeno (N) y fósforo (P) y el crecimiento posterior se producen en escalas de tiempo de minutos a pocas horas (Dignum, 2005). Por este motivo es que las floraciones resultan en fenómenos poco predecibles ya que muchas veces escapan a las ventanas temporales del monitoreo ambiental. Las floraciones de cianobacterias afectan negativamente al ecosistema ya que deterioran la calidad del agua, disminuyen la biodiversidad, y a su vez limitan o impiden el uso del agua para la potabilización o recreación. A su vez, las cianobacterias son organismos capaces de producir sustancias tóxicas (cianotoxinas) y otros metabolitos que pueden afectar al ser humano (Chorus & Bartram, 1999; Apeldoorn et al., 2007). Sin embargo, las cianobacterias son un grupo heterogéneo de organismos con grandes diferencias evolutivas y morfológicas entre sus órdenes que pueden resultar en respuestas específicas a cambios ambientales. De las cianobacterias florecedoras en ecosistemas límnicos se destacan las del orden Chroococcales (grandes colonias), Synechococcales (organismos unicelulares, coloniales y filamentosos), Oscillatoriales (filamentos sin células diferenciadas) y Nostocales (filamentos con células diferenciadas de resistencia y para la fijación de nitrógeno atmosférico) (Komárek et al., 2014). Debido a estas diferencias fisiológicas y morfológicas de las cianobacterias

resulta fundamental comprender los factores ambientales que desencadenan su crecimiento.

1.2. Producción de cianotoxinas

Se han realizado diversos estudios para esclarecer cuáles son los factores ecológicos o fisiológicos que desencadenan la producción de cianotoxinas (Zimmer & Ferrer, 2007; Murray et al., 2011; Neilan et al., 2012). Algunos autores mencionan que las cianotoxinas podrían ser metabolitos secundarios asociados al crecimiento (Carmichael, 1992; Paerl, 1997). Sin embargo, otros autores han demostrado que en presencia de depredadores o cambios en los factores ambientales como por ejemplo la luz y la concentración de sales, ocurre un aumento de la producción de toxinas (Utkilen & Gjølme, 1995; Jang et al., 2003; Castro et al., 2004; Carneiro et al., 2009; Beamud et al., 2015; Brentano et al., 2016). A su vez, existen varios estudios que relacionan la disponibilidad de nutrientes con la síntesis de toxinas. Para el caso de las cylindrospermopsinas (hepatotoxina, CYN) se demostró en cultivos de *Cylindrospermopsis raciborskii* (nostocal) que su síntesis era mayor en condiciones de deficiencia por N, cuando el mecanismo de fijación de N₂ está activo (Saker & Neilan, 2001). A su vez se identificó que la síntesis de CYN en *Aphanizomenon ovalisporum* (nostocal) se relaciona positivamente con la disponibilidad de N y con la deficiencia por P, y con las variaciones en la intensidad lumínica (Shalev-Malul et al., 2008; Bar-Yosef et al., 2010). En relación a las microcistinas (hepatotoxina, MYC) también se ha determinado que la concentración de nutrientes como N y P son factores que afectan la concentración de dicha toxina. Se ha demostrado en cultivos de *Oscillatoria agardhii* (oscillatorial) que la concentración de MYC aumentó en concordancia con el incremento en la concentración de N (Sivonen, 1990). Contrariamente, encontraron que *Nodularia spumigena* (nostocal) presenta una mayor concentración de nodularina (hepatotoxina, NOD) en cultivos deficientes por N (Pattanaik et al., 2010). Para el caso de las saxitoxinas (neurotoxina, STX), Cavaliere (2008) analizó cambios en la concentración de STX en cultivos de *C. raciborskii* frente a variaciones en la concentración de amonio y encontró que a mayores concentraciones del nutriente disminuye la concentración de STX. Por otro lado, un estudio reciente realizado en un lago dominado por *C. raciborskii* encontró una correlación positiva entre el aumento en

la disponibilidad de nitrógeno inorgánico disuelto y la conductividad con la concentración de STX (Brentano et al., 2016). Por lo tanto es esperable que el estado nutricional con respecto al nitrógeno incida en la capacidad de producción de las cianotoxinas, mientras que el fósforo sea el nutriente asociado al suministro de la energía necesaria para dicha síntesis. Sin embargo, otros estudios recientes realizados con cultivos de *C. raciborskii* y *Raphidiopsis brookii* indican que tanto la STX como la CYN serían metabolitos secundarios por lo que su transcripción y su síntesis no estarían relacionadas a factores ambientales específicos como lo son la disponibilidad de nutrientes, sino con su fase de crecimiento (Stucken et al., 2014; Willis et al., 2015; Vico et al., 2016). A su vez, en línea con los resultados de Vico et al. (2016), estudios con cultivos de *Microcystis* (chroococcal) han encontrado que bajo limitación por N la concentración de microcistina disminuye en proporción a la división celular, sugiriendo también que la concentración de MYC estaría regulada por factores ambientales de forma indirecta (Orr & Jones, 1998; Harke et al., 2016). La concentración de MYC estaría asociada a la tasa de crecimiento debido a que ésta depende de la disponibilidad de nitrógeno, y por lo tanto, ésta disponibilidad afecta indirectamente a la concentración de MYC (Long et al., 2001). En base a estos resultados sería esperable que la concentración de cianotoxinas esté afectada indirectamente por la disponibilidad de nutrientes como N y P.

1.3. Factores físicos que afectan el crecimiento de cianobacterias

Las características fisicoquímicas de los ecosistemas lénticos son factores determinantes para el crecimiento del fitoplancton (Reynolds, 2006). La temperatura es uno de los factores que afecta el crecimiento ya que incrementa la tasa metabólica de los organismos (Reynolds, 2006). Para el caso de las cianobacterias, se ha determinado que su rango óptimo de crecimiento se encuentra a temperaturas mayores a 25°C en comparación con otras algas como diatomeas o clorofitas (Paerl & Huisman, 2009; Jöhnk et al., 2008). Según algunos autores, esto les otorgaría una ventaja competitiva frente a otros grupos del fitoplancton en un escenario de cambio climático (Paerl & Huisman, 2008). Sin embargo, otros estudios demostraron que no hay diferencias significativas en las tasas de crecimiento de cianobacterias en comparación con clorofitas, por lo que otros factores explicarían el éxito de las cianobacterias (Lürling et

al., 2012). Uno de esos factores podría ser la regulación de la posición de las cianobacterias en la columna de agua, debido a la presencia de vacuolas de gas, ya que les confiere una ventaja competitiva única sobre las algas eucariotas, lo que puede explicar su predominancia (Lürling et al., 2012). Se ha predicho que la temperatura aumentará como resultado del cambio climático extendiendo el período de estratificación térmica estival en los lagos, lo que puede favorecer el crecimiento de cianobacterias en comparación con otros grupos del fitoplancton por su capacidad de regular la posición, debido a que serían más competitivas para la adquisición de la luz (Reynolds, 2006; Paerl & Huisman, 2008).

El incremento de la temperatura del agua, entre otros factores, afecta el ciclo de estratificación térmica de la columna de agua, lo que constituye otra de las características físicas determinantes para los organismos del fitoplancton. Los ciclos de estratificación térmica están determinados por los gradientes de densidad en la columna de agua producidos por la temperatura, lo que afecta la circulación de los gases y la concentración de nutrientes disponibles en la zona trofógena (o zona eufótica) (Kalff, 2001). En los lagos que presentan estratificación térmica estival, la columna de agua queda dividida en tres zonas: el hipolimnion (agua no turbulenta y aislada de la atmósfera), el epilimnion (en contacto con la atmósfera y deficiente en nutrientes disueltos), y la zona de transición entre el hipolimnion y el epilimnion, denominada metalimnion (Kalff, 2001; Lampert & Sommer, 2007). En condiciones de eutrofización, el hipolimnion se vuelve anóxico, lo que permite la liberación de nutrientes retenidos en los sedimentos, quedando potencialmente disponibles para ser captados por el fitoplancton. Sin embargo, esta capa de agua enriquecida en nutrientes permanece relativamente aislada del epilimnion cuando la estratificación es estable, provocando una potencial limitación en el crecimiento del fitoplancton en la zona trofógena.

La luz que reciben los organismos en la columna de agua constituye otra de las características físicas determinantes para el crecimiento del fitoplancton (Reynolds, 2006). La relación que existe entre la profundidad de la zona eufótica (Z_{eu}) y la profundidad de la zona de mezcla (Z_{mix}) tiene un efecto directo en la composición de la comunidad de fitoplancton ya que los organismos son trasladados dentro de la zona de mezcla por el movimiento de las masas de agua. Cuando la $Z_{eu} > Z_{mix}$ los organismos de fitoplancton se encuentran expuestos permanentemente a altas irradiancias lo que puede asegurar la fotosíntesis (Reynolds, 1994). En estos casos podrían sustentar su

crecimiento organismos como las algas verdes, las diatomeas e incluso las cianobacterias. Sin embargo, cuando la $Z_{eu} \ll Z_{mix}$ el fitoplancton pasará parte del día en una zona afótica por lo que su crecimiento puede estar limitado por disponibilidad de luz, particularmente a algunos grupos como grandes colonias de las algas verdes y diatomeas (Reynolds, 1994; Kalff, 2001).

Las características ecofisiológicas de las especies presentes en la comunidad de fitoplancton determinarán qué organismos se verán favorecidos en una u otra condición tanto de disponibilidad de nutrientes como de luz. Las cianobacterias planctónicas presentan características fisiológicas que les permitirían optimizar su crecimiento en condiciones de estratificación de verano, ya que pueden regular el acceso a la luz y a los nutrientes, principales limitantes de su crecimiento (Carey et al., 2012).

1.4. El papel de los nutrientes en el crecimiento de cianobacterias

En general, el incremento de la biomasa de cianobacterias en lagos está asociado al aumento de las concentraciones de N y P (Schindler et al., 1977; 2008; Conley et al., 2009; Dolman et al., 2012). Un aspecto relevante para el desarrollo de floraciones de cianobacterias es la forma en la cual los organismos reciben los nutrientes (Heisler et al., 2008). El nitrógeno es obtenido por las algas y cianobacterias mediante la incorporación de fracciones inorgánicas disueltas (NID) como amonio y nitrato; el primero es el que requiere menor gasto energético celular ya que es la forma más reducida (Whitton & Potts, 2002). Sin embargo, cuando la concentración NID es muy baja algunas cianobacterias tienen la capacidad de utilizar el nitrógeno atmosférico (N_2) a través de un proceso de fijación que puede ser llevado a cabo por células especializadas llamadas heterocitos (Whitton & Potts, 2002; Komárek et al., 2003; Flores & Herrero 2005). La fijación de N_2 es un proceso costoso desde el punto de vista energético en comparación con la incorporación activa de las fracciones de NID, pudiendo tener un efecto en la tasa de crecimiento de los organismos (Kenesi et al., 2009; Willis et al., 2016). En un estudio realizado con cultivos de *C. raciborskii*, especie fijadora de N_2 , se encontró que la tasa de crecimiento bajo condiciones deficientes por nitrógeno es menor comparada con condiciones de alta disponibilidad de nitrato y amonio (Kenesi et al., 2009). A su vez, en experimentos realizados con

Anabaena flos-aquae se registró la misma tendencia (Layzell et al., 1985). No obstante, otros estudios revelaron que *C. raciborskii* es capaz de exhibir altas tasas de crecimiento tanto en condiciones de suficiencia por nitrógeno inorgánico como en condiciones de deficiencia (Wood et al., 2014). Esta capacidad refleja una estrategia flexible de esta especie frente al uso de este nutriente para mantener su crecimiento, independientemente de la fuente de nitrógeno inorgánico disuelto (Spröber et al., 2003; Moisander et al., 2012).

Otro nutriente esencial para el crecimiento de las cianobacterias, y del fitoplancton en general, es el fósforo, que puede estar disponible en forma inorgánica disuelta, como ortofosfato. Cuando el fosfato se encuentra en bajas concentraciones puede ser limitante para el crecimiento (Schindler, 1977; Hudson et al., 2000). En condiciones de limitación, el fitoplancton activa los sistemas celulares de incorporación de fosfato (Rigler, 1956; Orchard et al., 2009; Wu et al., 2012). Cuando una concentración de fósforo aumenta en el medio externo (pulso de P) los organismos lo incorporan rápidamente. Posteriormente la concentración del nutriente disminuye a concentraciones tales (valor umbral) que ya no es viable energéticamente su incorporación (Falkner et al., 1986; Aubriot et al., 2011). Por lo tanto, el crecimiento del fitoplancton sólo será posible cuando la concentración de fosfato exceda el valor umbral, que generalmente se encuentra en el rango de concentración nanomolar, indetectable por los métodos analíticos convencionales (Aubriot et al., 2000). Una vez que el fosfato es incorporado, se almacena dentro de las células en forma de gránulos de polifosfato (cadenas inertes de fosfato) que serán utilizados para el crecimiento de los organismos (Kulaev & Vagabov, 1983). En el medio natural los organismos reciben el nutriente de forma generalmente fluctuante (pulsos de fosfato), desencadenando modificaciones en la regulación cinética de los sistemas de incorporación. Este cambio en la cinética de incorporación permite que los organismos puedan incrementar el valor umbral, independientemente de la cantidad de fosfato almacenado (Aubriot et al., 2011). De esta manera se genera así una respuesta flexible en la fisiología de los organismos tendiente a una optimización metabólica (Falkner et al., 1995).

Las cianobacterias florecedoras en particular muestran una alta capacidad de adaptación fisiológica a las fluctuaciones de fósforo que ocurren en escalas temporales muy cortas, logrando así optimizar su crecimiento (Aubriot et al., 2011; Aubriot & Bonilla, 2012).

Estudios recientes en grandes lagos (Yang et al., 2016) muestran que las cianobacterias florecedoras son capaces de mantener su biomasa a pesar de reducciones significativas en la concentración de N y P, debido a que son capaces de explotar eficientemente la disponibilidad de nutrientes durante eventos puntuales o fluctuaciones (ej, precipitaciones, mezcla de la columna de agua por acción del viento). Para que esto ocurra, la escala temporal de la respuesta fisiológica de las células (tiempo de reacción, t_R) debe ser más corta que la escala temporal de la fluctuación del nutriente (tiempo de exposición, t_E) (Aubriot et al., 2011). Las condiciones de mayor t_E pueden simularse mediante varios pulsos consecutivos de fosfato (Aubriot & Bonilla, 2012). En el caso de un único pulso de P, las poblaciones de cianobacterias deficientes por fosfato incorporan el nutriente rápidamente y la concentración ambiental de fosfato disminuye de forma neta resultando en un t_E menor al t_R . De esta forma las cianobacterias mantienen una cinética de incorporación de fosfato relativamente incambiada. Sin embargo, cuando el t_E es mayor al t_R , las cianobacterias tienen tiempo suficiente para regular sus sistemas de incorporación, disminuyendo la tasa de incorporación de fosfato y aumentando el valor umbral. Ambos fenómenos están asociados a una disminución de la energía utilizada en la captación del recurso y, por lo tanto, una mayor optimización del crecimiento (Amaral et al., 2014). Un estudio realizado con una comunidad natural de fitoplancton dominada por cianobacterias (*Planktothrix agardhii* y *Raphidiopsis mediterránea*) demostró que cuando la comunidad fue expuesta a pulsos de fosfato exhibió una mayor tasa de crecimiento que la sometida a un único pulso (Aubriot & Bonilla, 2012). Por lo tanto, las fluctuaciones rápidas (minutos) en la concentración de fosfato disponible tienen consecuencias directas en la tasa de crecimiento de las cianobacterias (Amaral et al., 2014). La capacidad celular de regular rápidamente los sistemas de incorporación de fosfato (modificando el valor umbral) y de almacenar el nutriente (gránulos de polifosfato) le otorga a las cianobacterias ventajas adaptativas frente a otros organismos del fitoplancton para el crecimiento en condiciones limitantes y fluctuantes del recurso.

1.5. El caso particular de *Cylindrospermopsis raciborskii*

Un organismo modelo para estudiar los fundamentos ecofisiológicos de la dominancia de cianobacterias es *Cylindrospermopsis raciborskii* (Orden Nostocales, especie neuro y hepatotóxica). Esta especie está presente en varios ecosistemas acuáticos del país destinados a la potabilización y recreación (Vidal & Kruk, 2008; Fabre et al., 2010; Fabre, 2011; Martigani, 2012), y es mundialmente estudiada por su alta toxicidad y su capacidad de colonizar nuevos hábitats. Asimismo, su interés se basa en que esta cianobacteria muestra un patrón complejo con respecto al incremento de la concentración de nutrientes en lagos. Varios estudios han demostrado que el biovolumen de *C. raciborskii* se encuentra inversamente correlacionado a la concentración de PT en los ecosistemas acuáticos donde se la ha registrado (Bonilla et al., 2012; Hennenman & Petrucio, 2016). Posselt et al. (2009) determinaron que *C. raciborskii* domina el fitoplancton cuando la comunidad es expuesta a fluctuaciones esporádicas de P. Un estudio reciente con cepas de la especie demostró que su tasa de crecimiento se duplica frente a secuencias de pulsos de P, pudiendo adaptar su fisiología en un corto plazo (minutos) (Amaral, 2011; Amaral et al., 2014). Por tanto, el uso del nutriente de esta especie no estaría basada en la cantidad de P incorporada, sino en la optimización energética lograda por la regulación de la incorporación de fosfato que pueda realizar de acuerdo al tiempo de exposición (t_E) del organismo al nutriente, como fue encontrado en comunidades de otras cianobacterias filamentosas (Aubriot & Bonilla, 2012). Sin embargo, se desconoce qué papel puede cumplir esta flexibilidad fisiológica (Amaral et al., 2014) en el contexto de la comunidad de fitoplancton y si se asocia con la capacidad florecedora de *C. raciborskii*.

1.6. Justificación del trabajo

Esta tesis busca aportar conocimientos de la ecofisiología de cianobacterias en condiciones nutricionales subóptimas de crecimiento. Los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen a mejorar la comprensión del crecimiento de cianobacterias en condiciones naturales de estrés nutricional, o inducidos durante medidas de recuperación de ambientes eutrofizados. A su vez, busca identificar el papel de la

flexibilidad fisiológica en el crecimiento de cianobacterias florecedoras para comprender mejor este fenómeno de creciente impacto nacional y mundial. Se aportará información acerca de los mecanismos ecofisiológicos de corta escala temporal que propician el desarrollo de floraciones. Esta información permitirá contribuir a elaborar modelos predictivos más realistas sobre el crecimiento de cianobacterias.

2. Objetivos y Predicciones

2.1. Objetivos

El objetivo general de esta tesis es analizar el crecimiento de poblaciones de cianobacterias frente a pulsos de nutrientes aplicados en diferentes escalas temporales y su papel en el desarrollo de floraciones tóxicas en un ecosistema léntico eutrófico de Uruguay.

2.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la relación entre la disponibilidad de nutrientes y la estructura de la comunidad de fitoplancton del lago Javier en el período de estratificación de verano (temprana, media y tardía).
2. Analizar el efecto de diferentes tiempos de exposición al P y la disponibilidad de nitrógeno inorgánico disuelto en la tasa de crecimiento de las especies dominantes de cianobacterias.
3. Analizar la relación entre el estado nutricional de las cianobacterias y la concentración de las toxinas saxitoxinas (STX) y microcistinas (MYC).

2.3. Predicciones

1. La comunidad de fitoplancton estará dominada por cianobacterias en los tres muestreos de estratificación de verano ya que son organismos que tienen la capacidad de crecer bajo condiciones nutricionales subóptimas.

2. Cuando el tiempo de exposición al fósforo sea mayor las cianobacterias exhibirán su mayor tasa de crecimiento en una comunidad natural de fitoplancton. Asimismo, la baja disponibilidad natural de las formas inorgánicas disueltas de nitrógeno propiciará el desarrollo de cianobacterias tóxicas fijadoras de N_2 .

3. La concentración de toxina por unidad de biomasa de cianobacterias será mayor en la condición de mayor tiempo de exposición al P ya que es la condición que propiciará un mayor crecimiento de cianobacterias y por tanto una mayor tasa metabólica

3. Metodología y área de estudio

3.1. Estrategia metodológica

El abordaje que tendrá este trabajo consistirá en análisis en campo y a su vez contará con trabajo experimental. El trabajo de campo es clave para abordar el primer objetivo específico propuesto y desencadenante a su vez del trabajo experimental que será utilizado para cumplir con los otros dos objetivos específicos propuestos. Los experimentos propuestos en esta tesis son realizados con agua proveniente del ecosistema a muestrear y las condiciones fisicoquímicas que se registren en el mismo son claves para poder desarrollar los experimentos.

3.2. Área de estudio

El lago Javier está ubicado en Parque Miramar, Canelones, Uruguay ($34^{\circ}51'S$, $56^{\circ}02'O$) (**Fig. 1**). Es un lago artificial generado por la remoción de arena y actualmente tiene uso recreativo por los habitantes que viven en su zona litoral. Tiene un área de 23.5 há y una profundidad máxima de 11 m (Fabre et al., 2010). Es un lago monomítico, con un período de estratificación durante el verano seguido de la mezcla de la columna de agua en otoño e invierno, y se nutre de agua por el aporte de las napas freáticas y la lluvia. El lago presenta condiciones de eutrofia a hipereutrofia y se ha

determinado que está dominado por la cianobacteria invasora potencialmente tóxica *Cylindrospermopsis raciborskii* (Fabre et al., 2010; Somma, 2014).

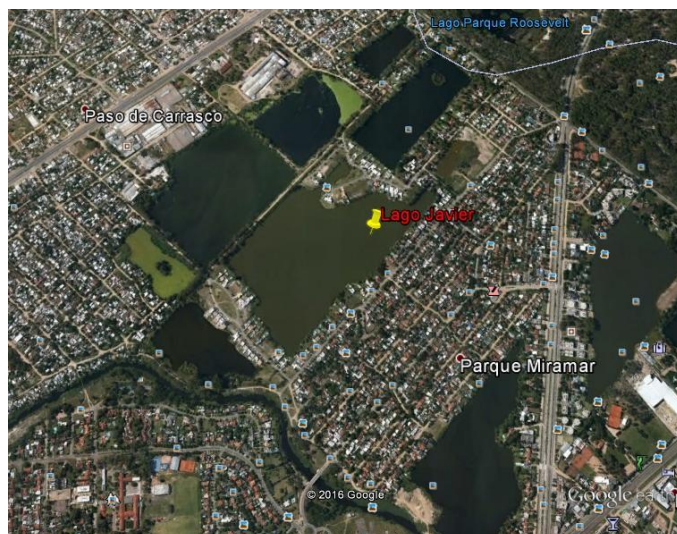


Figura 1: Fotografía satelital del lago Javier (pin amarillo), en Parque Miramar, Departamento de Canelones, Uruguay. Tomada de Google Earth (versión 7.1.5.1557).

3.3. Mediciones *in situ* y análisis de laboratorio

En el lago Javier se realizaron tres muestreos en diferentes etapas de la estratificación de verano: estratificación temprana (Ete, Noviembre 2013), media (Eme, Febrero 2015) y tardía (Eta, Marzo 2014). En cada muestreo se evaluó la físico-química de la columna de agua mediante mediciones *in situ*. Se realizaron perfiles verticales de parámetros limnológicos como oxígeno disuelto (OD), luz (PAR) y temperatura (T), con sensores Horiba © D-25 cada 20 cm hasta alcanzar los 8 m de profundidad. Con la información obtenida del perfil vertical de luz se determinó el coeficiente de extinción de la luz (k_d , m^{-1}) y la profundidad de la zona eufótica (Z_{eu} , m). Se determinó la profundidad de la zona de mezcla (Z_{mix} , m) como la profundidad de la termoclina a la cual se produce el cambio mayor de estabilidad y un gradiente Δt en un metro de profundidad ≥ 0.5 °C, desde la superficie, definido para sistemas subtropicales templados (Esteves, 2011). La estabilidad se calculó como:

$$E (cm^{-1}) = (1/\delta) (d\delta/dz)$$

dónde δ es la densidad del agua a una determinada profundidad y $d\delta/dz$ corresponde a la diferencia de densidad a dos profundidades determinadas. Esta diferencia de densidad fue medida cada 20 cm. Se determinó la relación entre la zona eufótica y la zona de mezcla (Z_{eu}/Z_{mix}) que resulta en un indicador del régimen de luz al que están expuestos los organismos sometidos al movimiento del agua, y la cantidad de luz instantánea en la zona de mezcla (I_{mix} , $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) según el modelo de Wiedner et al. (2007) modificado:

$$I_{mix} = I_{subsup} \cdot (1 - e^{-k_d \cdot Z_{mix}}) / k_d \cdot Z_{mix}$$

En donde la I_{subsup} corresponde a la intensidad de luz subsuperficial ($\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) que se define como la cantidad de luz total que ingresa a la columna de agua.

Se tomaron muestras de agua subsuperficial con bidones opacos, para el posterior análisis de nutrientes disueltos (fracciones disueltas de nitrógeno y fósforo) y totales (nitrógeno total y fósforo total), y para la determinación de la clorofila *a* por extracción con etanol caliente (Nusch, 1980, modificado). Las fracciones disueltas de nitrógeno determinadas fueron: Nitrito (NO_2^-), Nitrato (NO_3^-) y Amonio (NH_4^+), mientras que la de fósforo fue fosfato reactivo soluble (PRS) (APHA, 1985). Las fracciones de nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT) fueron determinadas con el método de Valderrama (1981).

También se tomaron muestras de agua subsuperficial para el análisis cuantitativo de la comunidad de fitoplancton con una botella muestreadora (tipo Ruttner). Las muestras se mantuvieron en oscuridad y a baja temperatura durante el transporte al laboratorio donde fueron fijadas con lugol. La cuantificación se realizó en cámaras Sedwick-Rafter de 1 ml mediante la selección de campos aleatorios hasta cuantificar 100 organismos del taxa o especie más abundante, de acuerdo a Sournia (1978). Este último método de conteo es el más apropiado para sistemas eutróficos con altas abundancias de cianobacterias. El análisis taxonómico en las muestras cuantitativas fue al menos hasta el nivel de género, con énfasis en la identificación de especies de cianobacterias, ya que consisten en el grupo objetivo de este trabajo. El biovolumen de cada especie o género se calculó en base a figuras geométricas aproximadas según Hillebrand *et al.* (1999). Para esto se midió el largo (μm), el ancho (μm) y profundidad (μm) de 30 individuos de la especie más abundante y en el caso de especies o taxa que presentaron una abundancia menor a 30 se midieron dichas dimensiones en el número total de

individuos encontrados en cada muestra. Se calculó el biovolumen de cada individuo y luego se realizó un promedio del biovolumen de esa especie para cada fecha de muestreo.

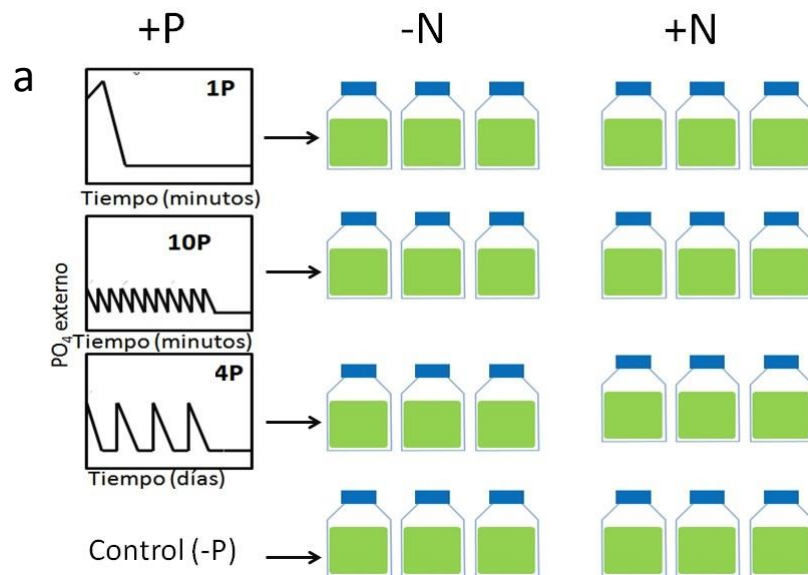
Las cianotoxinas que se determinaron fueron las saxitoxinas (STX, neurotoxina) y microcistinas totales (MYC, hepatotoxina). Las muestras (1 ml) fueron tomadas del agua subsuperficial del lago y se conservaron en criotubos a -20 °C hasta su posterior análisis. La cuantificación de STX y MYC se realizó a través de inmunoensayos de tipo ELISA. El límite de detección para este ensayo es de 0.02 µg l⁻¹ para STX y de 0.3 µg l⁻¹ para MYC. Los análisis de cuantificación de toxinas fueron llevados a cabo por el Departamento de Biociencias de la Facultad de Química (equipo de investigación de la Dra. Beatriz Brena).

3.4. Experimentos con nutrientes

Para evaluar la flexibilidad fisiológica de las poblaciones de cianobacterias se realizaron dos experimentos con la comunidad natural del lago Javier. En dos de los muestreos realizados, Noviembre 2013 (Ete, experimento A) y Febrero 2015 (Eme, experimento B), se tomó un inóculo de 30 litros de agua subsuperficial en una bolsa plástica oscura y se trasladó al laboratorio dentro de una conservadora donde se realizó la incubación. Se eligieron esos dos muestreos, de los tres que se realizaron, ya que fueron los dos que mostraron diferencias en la composición de especies de la comunidad de fitoplancton y a su vez fueron los dos muestreos más similares en relación a su estructura fisicoquímica. Los inóculos de 700 ml de agua fueron repartidos en botellas de 1 litro de tipo schott. Ambos experimentos se desarrollaron a una intensidad de luz de 90 µmol fotón m⁻² s⁻¹, con un fotoperíodo de 12:12 h luz: oscuridad y a 23 °C. Previo al inicio del experimento las muestras de agua se dejaron en aclimatación a las condiciones experimentales durante 24 horas. El experimento A consistió en la adición de una concentración inicial de fosfato de 10 µM, suficiente para duplicar la biomasa, mientras que en el experimento B se utilizó 33 µM de fosfato, lo que representa una concentración de suficiencia para el crecimiento de los organismos. Estas dos concentraciones fueron utilizadas para evaluar posibles diferencias en el crecimiento del fitoplancton. Según Aubriot (2008) y Aubriot & Bonilla (2012), las diferencias de t_E

entre patrones de pulsos en rangos elevados de concentración de fosfato se minimizan. Esto se debe a que los pulsos de alta concentración aplicados producen un tiempo de exposición al fosfato prolongado que desactiva a los sistemas de incorporación de membrana (Aubriot et al. 2011). En la **Figura 2** se esquematizan los resultados esperados para ambas concentraciones y sus respectivos tiempos de exposición teóricos.

La incubación de la comunidad natural consistió en seis tratamientos (con 3 réplicas c/u) simulando escenarios naturales de fluctuaciones de P con diferentes tiempos de exposición (t_E). Por lo tanto, en ambos experimentos, la concentración de fósforo se añadió de tres formas: tratamiento 1P, concentración añadida en un solo pulso (menor t_E); tratamiento 4P: adición de la misma concentración dividida en 4 pulsos, uno cada 8 horas (t_E intermedio); y tratamiento 10P, adición de la misma concentración dividida en diez pulsos (mayor t_E , un pulso cada 10 min). El control consistió en la muestra natural del lago sin la adición de P (0P). A su vez se trató cada tratamiento y control de P con y sin adición de N (+N y -N respectivamente) con una concentración de 16 veces la concentración de P, totalizando de esta manera seis tratamientos y dos controles (**Fig. 2**).



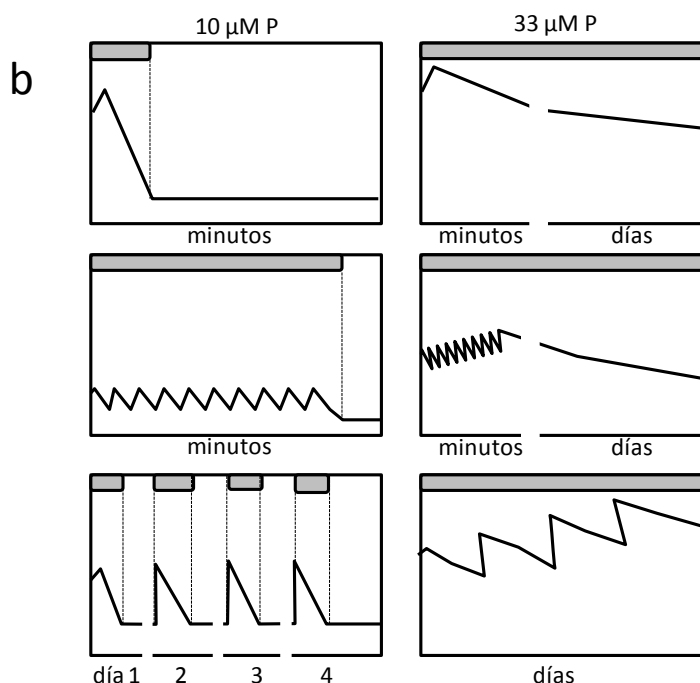


Figura 2: a: diagrama representativo del diseño experimental utilizado en los experimentos. b: respuestas esperadas de incorporación de fosfato en la concentración intermedia, 10 μM y de saturación, 33 μM . Se muestra la cinética de incorporación de fosfato en ambos casos (línea) y los tiempos de exposición teóricos (t_E) en las barras grises, según el modelo de Aubriot & Bonilla (2012). Cuando la línea es horizontal se asume que la incorporación de fosfato es igual a cero ya que se alcanzó el valor umbral.

El seguimiento diario de cada experimento se realizó mediante la medición de la densidad óptica (DO, absorbancia a 750 nm) como indicador indirecto de biomasa del fitoplancton. Previo a la toma de muestras, todas las botellas fueron mezcladas suavemente. Para la medición de DO se utilizó un espectrofotómetro Thermo Scientific, Evolution 60 LC. Este seguimiento nos permitió identificar el inicio del crecimiento y el final de la fase de crecimiento exponencial. El día de finalización de ambos experimentos fue definido cuando la DO fuese igual a la del inicio. En ambos experimentos se pudo observar que el final de la fase exponencial correspondió al quinto día del experimento ($t=5$). La finalización de los experimentos fue estipulada en el día 15 en el experimento A y en el día 11 en el experimento B.

Para determinar el crecimiento específico de cianobacterias y de la comunidad de fitoplancton durante el transcurso de ambos experimentos se tomaron alícuotas de cada réplica y de cada tratamiento al inicio de los experimentos ($t=1$), cuando se alcanzó la fase exponencial de crecimiento ($t=5$) y al final de los mismos ($t=15$ en Exp A y $t=11$ en

Exp B). Las mismas fueron fijadas con lugol y conservadas en oscuridad para su posterior análisis cuantitativo a través de microscopía óptica. La cuantificación se realizó en cámaras Sedwick-Rafter de 1 ml mediante la selección de campos aleatorios hasta cuantificar 100 organismos del taxa o especie más abundante, de acuerdo a Sournia (1978). Se realizó especial énfasis en la identificación de especies de cianobacterias, mientras que el resto de los grupos que componen la comunidad de fitoplancton se identificó a nivel de género. Se determinó el biovolumen que representan las especies o taxa, como se describió en sección 3.2.

Para determinar la tasa de crecimiento de la comunidad de fitoplancton (μ_{crec} , d^{-1}) en cada tratamiento y cada réplica se utilizó el biovolumen total, ya que es un indicador directo de la biomasa del fitoplancton. La estimación se realizó acorde a la siguiente función:

$$\mu_{\text{crec}} (\text{d}^{-1}) = (\ln \text{BV final} - \ln \text{BV inicial}) / \Delta t \text{ (función 1)}$$

Dónde BV final es el biovolumen de la comunidad al final de la fase exponencial de la curva de crecimiento, BV inicial es el biovolumen de la comunidad al inicio de la fase exponencial de la curva de crecimiento y Δt es el intervalo de tiempo transcurrido desde el inicio al final de la fase exponencial de crecimiento. A su vez, con la información obtenida del análisis cuantitativo de la comunidad, se clasificaron a las especies de cianobacterias registradas en los órdenes según Komárek et al (2014). Una vez agrupadas en sus órdenes respectivos se estimó la tasa de crecimiento ($\mu_{\text{crec orden}}$, d^{-1}) de cada orden para cada tratamiento y cada réplica en dos fases, exponencial y tardía. En la **Figura 3** se puede observar de forma esquemática a qué etapa del experimento corresponden las tasas de crecimiento en fase exponencial o tardía. Las tasas de crecimiento se determinaron de la siguiente manera:

$$\mu_{\text{crec Orden}} = \ln (\text{BV final Orden}_x + 2) - \ln (\text{BV inicial Orden}_x + 2) / \Delta t \text{ (función 2)}$$

Para el caso de la tasa de crecimiento en fase exponencial ($\mu_{\text{exp Orden}}$) el BV final Orden_x corresponde al biovolumen de un determinado Orden al final de la fase exponencial, el BV inicial Orden_x corresponde al biovolumen inicial de ese Orden al inicio del experimento, y el Δt corresponde al lapso de tiempo en días en el que ocurre

la fase exponencial de crecimiento. En este caso se aplicó a los datos una función de $\ln(x+2)$ para poder estimar aquellos BV de Órdenes que presentaban como dato un cero, es decir, que no aparecieron especies de ese orden en el conteo. Para el caso de la tasa de crecimiento en la fase tardía ($\mu_{tar_{Orden}}$) los BV utilizados corresponden al biovolumen del Orden_x al final del experimento (BV final Orden_x) y el BV del Orden al final de la fase exponencial de crecimiento (BV inicial Orden_x). Los valores de $\mu_{exp_{Orden}}$ y $\mu_{tar_{Orden}}$ negativos reflejan una disminución en el biovolumen del Orden dado, mientras que las variaciones en la magnitud de la pendiente reflejan la velocidad tanto en el aumento de su biovolumen como en la disminución del mismo.

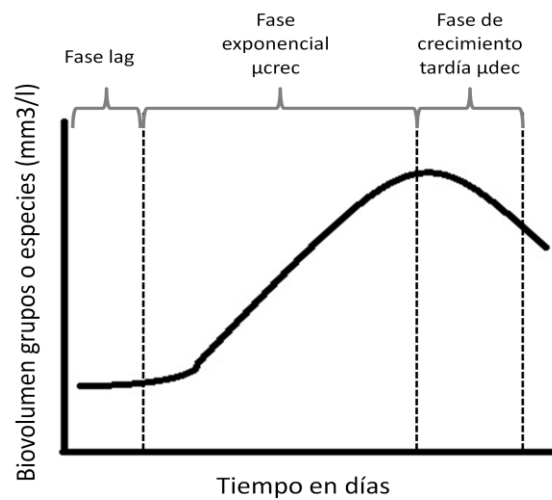


Figura 3. Representación esquemática del transcurso del experimento que indica en qué momentos fueron estimadas las tasas de crecimiento exponencial y tardía.

Para evaluar cómo las especies responden a los diferentes t_E utilizados, se eligieron cuatro especies que resultaron dominantes en biovolumen (>30% del biovolumen total de fitoplancton) en el transcurso de los experimentos. Para cada una de ellas se estimó: las tasas específicas de crecimiento exponencial y tardía ($\mu_{exp_{esp}}$, d^{-1} , $\mu_{tar_{esp}}$, d^{-1} respectivamente) de la forma que estipula la función 2. Para el caso de las especies no fue utilizada la transformación $\ln(x+2)$ y solamente se usó el $\ln$ del biovolumen. Las especies que no se identificaron con el método de conteo utilizado (sección 3.2) se consideraron que pudieran haber estado presentes como especies raras o no estar presentes. En los casos en que se identificó una especie en un tratamiento en tiempo 1, 5

o final (en función de los experimentos), pero no se registró en otro día, se asumió que la especie estaba presente en muy baja abundancia y por debajo del límite de cuantificación. En estos casos, y para poder calcular luego las tasas de crecimiento se adjudicó un valor de abundancia igual a la mitad de la abundancia mínima registrada en la muestra dada (1, 5 o final). Luego, para estimar el BV, se multiplicó ese valor de abundancia por el volumen específico de esa especie en el día más cercano que fue registrada en el conteo.

Al final del experimento se tomaron muestras de cada réplica y de cada tratamiento para determinar la producción de saxitoxinas (STX) y microcistinas totales (MYC) y la concentración de nutrientes disueltos y totales y clorofila *a* por extracción. La concentración de toxinas, tanto STX como MYC, fueron determinadas a través del método ELISA por el Departamento de Biociencias de la Facultad de Química (equipo de investigación de la Dra. Beatriz Brena). El límite de detección para este ensayo es de 0.02 $\mu\text{g l}^{-1}$ para STX y de 0.3 $\mu\text{g l}^{-1}$ para MYC. La concentración de nutrientes disueltos, nutrientes totales y clorofila *a* por extracción fueron determinadas en el laboratorio, acorde a las metodologías mencionadas anteriormente.

3.5. Análisis de datos

Para el análisis de datos se utilizaron los programas SigmaPlot (versión 11.0) y R (versión 3.2.5). Se realizaron ANOVAS de 1 vía (factor: muestreo) para detectar diferencias significativas entre variables limnológicas (nutrientes, clorofila *a*). Se realizaron análisis de regresión simple para evaluar la relación entre la biomasa de cianobacterias y la concentración de nutrientes en el lago.

Se realizaron análisis de ordenación, previamente explorando mediante DCA (Detrended Correspondence Analysis) el largo del gradiente para determinar qué método utilizar, unimodal (largo del gradiente ≥ 4) o lineal (largo del gradiente ≤ 3) (Leps y Smilauer, 1999). A partir de este análisis se seleccionaron modelos lineales. Para evaluar la semejanza entre los casos (biovolumen de las especies) a través de las variables consideradas (diferentes muestreos) se realizó un análisis de componentes principales (ACP) (Legendre & Legendre, 2002). Este tipo de análisis permite evaluar si

existen grupos de muestras semejantes en función del tiempo y a su vez si existe correlación entre ellas o no a través de un análisis de correlación no paramétrico como el análisis de correlación de Spearman (Legendre & Legendre, 2002). Para determinar el número de componentes que presentará la representación gráfica se utilizó el método del palo quebrado (Frontier, 1976). Este método permite la elección del número de autovalores que explican la mayor varianza de los datos. Las especies que se utilizaron para este método de ordenación fueron aquellas que superaron el 1% del biovolumen total de fitoplancton en al menos uno de los tres muestreos (Ete, Eme y Eta).

Para determinar el estado nutricional de la comunidad de fitoplancton en el epilimnion se utilizó como referencia la relación estequiométrica general establecida por Redfield (1958) de nitrógeno y fósforo (NT:PT, NID:PRS). Si la relación atómica NT:PT es cercana a 16, se considera que la comunidad se encuentra en un rango nutricional óptimo teórico. Si dicha relación está por encima de este valor (16), y la concentración de nutrientes disueltos es cercana a los límites de detección de los métodos analíticos utilizados, indicaría un estado nutricional deficiente por P, mientras que si se encuentra un valor por debajo de 10, indicaría un estado nutricional deficiente por N, pudiendo existir una co-limitación de ambos nutrientes entre dichos valores (Arrigo, 2005).

Para el segundo objetivo se realizaron análisis de varianza (ANOVA) multifactorial. Uno de los factores de análisis es el P con 4 niveles (0P, 1P, 4P, 10P), y el otro factor es el N, con 2 niveles (+N y -N). Este análisis fue utilizado para evaluar si existieron diferencias significativas en las biomásas alcanzadas en los experimentos, las tasas de crecimiento exponencial y tardía de los órdenes y las específicas. En caso de que los datos no cumplieran con los test de normalidad y homogeneidad de varianza, como así lo requiere el ANOVA, se realizaron test de Kruskal-Wallis.

Con relación al tercer objetivo específico se determinó la tasa de cambio de la concentración neta de toxinas (STX y MYC) entre el inicio (días de los muestreos de Ete y Eme) y el final de los experimentos (experimento A y B). Para evaluar el efecto de la adición de los nutrientes en la producción de cianotoxinas se estandarizó la concentración de la misma por unidad de biovolumen de cianobacterias y se evaluó la tasa de cambio respecto al inicio para cada tratamiento mediante ANOVA de dos vías. En este ANOVA se determinaron dos factores fijos: P con 4 niveles (0P, 1P, 4P y 10P) y N 2 niveles (+N y -N). A su vez se realizaron regresiones lineales entre la

concentración de cianotoxinas y la biomasa máxima registrada de las especies dominantes, y potencialmente productoras de cada toxina, para determinar si existía una relación entre el aumento del biovolumen de cianobacterias y la concentración de toxinas detectada al final de los experimentos.

4. Resultados

4.1. Objetivo específico 1. *Evaluar la relación entre la disponibilidad de nutrientes y la estructura de la comunidad de fitoplancton del lago Javier en el período de estratificación de verano (temprana, media y tardía).*

En las tres fechas de muestreo, que se correspondieron con diferentes estadios de la estratificación del verano, la temperatura superficial del lago Javier varió desde 20.7 °C (estratificación temprana) a 25.2 °C (estratificación media) (**Fig. 4**). La termoclina se ubicó a los 3.5 m en la fase temprana hasta alcanzar los 8.0 m en la fase tardía. El muestreo donde se registró mayor temperatura fue el de estratificación media (Eme), lo que permite una mayor estabilidad del metalimnion (**Fig. 4**).

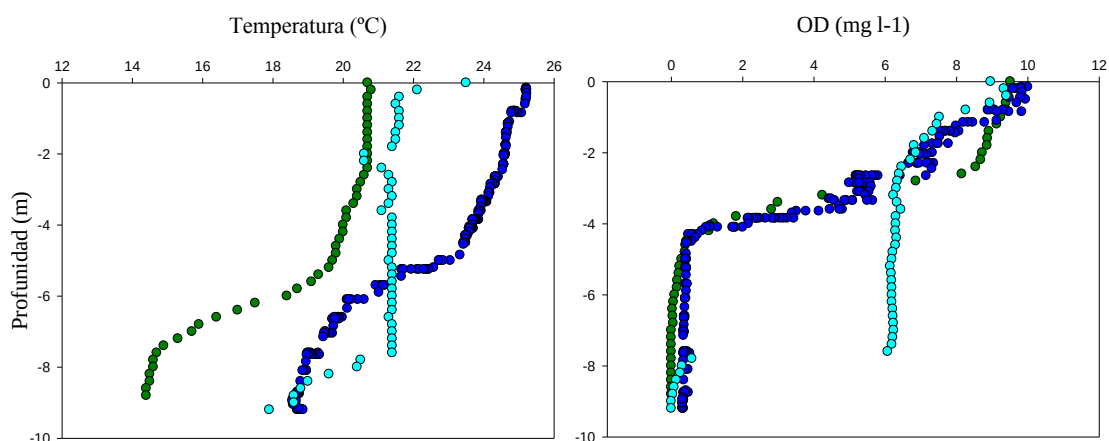


Figura 4. Perfiles verticales de temperatura (izquierda) y oxígeno disuelto (OD, derecha) para las tres fechas de muestreo del lago Javier. Los círculos verdes corresponden a la fecha de estratificación temprana (Ete, Noviembre 2013), los azules corresponden a la fecha de estratificación media (Eme, Febrero 2015) y los turquesas a la fecha de estratificación tardía (Eta, Marzo 2014)

En las tres fechas de muestreo se pudo registrar un perfil clinógrafo de la concentración de oxígeno disuelto (OD). En el epilimnion de los muestreos de Ete y Eme la concentración de OD varió entre 10.0 y 3.0 mg l⁻¹, mientras que en la fecha de Eta varió entre 10 y 6 mg l⁻¹. Cabe destacar que por debajo de la termoclina, en todos los muestreos, el hipolimnion del lago se encontró en condiciones anóxicas (**Fig. 4**).

Tabla 1. Concentración de clorofila *a*, parámetros limnológicos estimados, nutrientes disueltos, nutrientes totales y la relación atómica de Redfield para los nutrientes totales y disueltos determinados en epilimnion del Lago Javier. Noviembre 2013 corresponde al inicio de la estratificación (estratificación temprana, **Ete**), Febrero 2015 a un estadio medio (Estratificación media, **Eme**) y Marzo 2014 corresponde al final de la estratificación (Estratificación tardía, **Eta**). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras.

	Ete		Eme		Eta	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Clo-<i>a</i> (µg l⁻¹)	107.1 (a)	3.4	102.0 (a)	6.4	139.0 (b)	6.5
K_d (m⁻¹)	3.1		4.2		4.6	
Z_{eu} (m)	1.5		1.1		1.0	
Z_{mix} (m)	3.5		5.0		8.0	
Z_{eu}/Z_{mix}	0.43		0.21		0.12	
I_{mix} (µmol fotón m⁻² s⁻¹)	77.5		-		44.40	
NH₄⁺ (µg l⁻¹)	26	18	16	6	43	5
NO₃⁻ (µg l⁻¹)	82 (a)	9	<50 (bc)	18	70 (ac)	10
NO₂⁻ (µg l⁻¹)	<2.8		<2.8		<2.8	
PRS (µg l⁻¹)	14 (a)	1	<10 (bc)	4	13 (ac)	0
NT (µg l⁻¹)	2317 (a)	172	1931 (a)	489	2680 (b)	92
PT (µg l⁻¹)	78 (bc)	2	76 (ac)	4	60 (b)	2
NT:PT	66		56		98	
NID:PRS	17		14		20	

En el muestreo Eta se registró el mayor valor del coeficiente de extinción de la luz (K_d), y el mayor valor de clorofila *a*, en comparación con los otros dos muestreos (p<0.05). La zona eufótica (Z_{eu}) máxima se registró en Ete (1.5 m) y la mínima en Eta (1.0 m).

Para los tres muestreos realizados la relación entre la zona eufótica y la zona de mezcla (Z_{eu}/Z_{mix}) fue menor a 1 (**Tabla 1**).

En las tres fechas de muestreo se observaron concentraciones bajas de nutrientes disueltos en el epilimnion. En particular, en la fecha correspondiente al momento de Eme, las concentraciones de nutrientes disueltos, salvo la de amonio (NH_4^+), fueron indetectables. Para el NO_3^- y el PRS se observaron diferencias significativas entre los muestreos de Ete y de Eme ($p < 0.05$) (**Tabla 1**). En la estación Eta se registraron las mayores concentraciones de NT ($p < 0.05$). Para el PT se observó un patrón inverso al NT. La menor concentración de PT fue registrada en el muestreo de Eta, significativamente menor a la registrada en Eme ($p < 0.05$). Las altas relaciones atómicas de Redfield estimadas con la concentración de nutrientes totales (NT:PT) sumado a la baja concentración de nutrientes disueltos, principalmente de PRS, indicaron una limitación potencial en el crecimiento del fitoplancton por el fósforo para los tres casos (**Tabla 1**).

En relación a la composición de la comunidad de fitoplancton, los tres muestreos mostraron un número similar de taxa. El phylum que presentó mayor número de taxa en los tres estadios de estratificación fueron las cianobacterias (13) y las microalgas verdes (10) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Lista de taxa, géneros y especies registradas en los tres muestreos realizados. Ete refiere al muestreo de Estratificación temprana (Noviembre 2013), Eme al muestreo de estratificación media (Febrero 2015) y Eta al muestreo de estratificación tardía (Marzo 2014). NI: no identificados.

Phylum	Taxa	Ete	Eme	Eta
Bacillariophyta	<i>Diatomea pennada</i>	x	x	x
Bacillariophyta	<i>Diatomea céntrica</i>	x		x
Bacillariophyta	<i>Aulacoseira distans</i>	x		
Chlorophyta	<i>Monoraphidium</i> spp.	x	x	x
Chlorophyta	<i>Scenedesmus</i> spp.	x	x	x
Chlorophyta	<i>Closterium</i> sp.	x		
Chlorophyta	<i>Oocystis</i> sp.	x	x	x
Chlorophyta	<i>Tetraedron minimum</i>	x	x	x
Chlorophyta	<i>Botryococcus</i> sp.	x	x	x
Chlorophyta	<i>Pseudodydinocystis</i> sp.		x	x
Chlorophyta	<i>Coelastrum</i> spp.		x	x
Chlorophyta	<i>Eudorina</i> sp.		x	

Chlorophyta	<i>Ankistrodesmus</i> sp.			x
Cryptophyta	<i>Cryptomonas</i> spp.	x	x	x
Cyanobacteria	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	x	x	x
Cyanobacteria	<i>Planktothrix agardhii</i>	x	x	x
Cyanobacteria	<i>Aphanizomenon</i> cf. <i>gracile</i>	x	x	x
Cyanobacteria	<i>Pseudanabaena</i> sp.	x	x	x
Cyanobacteria	<i>Planktolyngbya</i> sp.	x	x	x
Cyanobacteria	<i>Aphanocapsa</i> spp.	x		
Cyanobacteria	<i>Aphanocapsa conferta</i>		x	x
Cyanobacteria	<i>Aphanocapsa incerta</i>		x	x
Cyanobacteria	Microcystaceae spp.	x	x	x
Cyanobacteria	<i>Merismopedia tenuissima</i>		x	x
Cyanobacteria	Cyanobacteria no identificada		x	x
Cyanobacteria	Células de Microcystaceae		x	
Cyanobacteria	<i>Sphaerocavum brasiliensis</i>			x
Dinophyta	<i>Ceratium hirudinella</i>	x	x	x
Dinophyta	<i>Peridinium</i> sp.	x	x	x
Euglenophyta	<i>Trachelomonas volvocenopsis</i>	x	x	x
Euglenophyta	<i>Euglena</i> spp.	x		x
NI	No identificado < 10 micras	x	x	x
	Total de taxa	22	25	27

El mayor biovolumen de fitoplancton fue registrado en Eta ($60 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$) y el menor en Ete ($44 \text{ mm}^3 \text{ l}^{-1}$) (**Fig. 5**). En el muestreo de Eta se registró una mayor contribución de cianobacterias al biovolumen total del fitoplancton (84%) en comparación con la de eucariotas (16%). En los otros dos muestreos, Ete y Eme, la contribución de cianobacterias al biovolumen total de fitoplancton fue de 58.2 y 73.5% respectivamente, mientras que la de eucariotas fue de 41.7 y 26.4% respectivamente. La especie que presentó mayor contribución al BV total de cianobacterias fue *Cylindrospermopsis raciborskii* en Eme (73.2%) y Eta (79.2%). En el muestreo de estratificación temprana (Ete) se registraron dos especies de cianobacterias que sumadas dominaron la comunidad de fitoplancton (*Planktothrix agardhii*, 14.4% y *Aphanizomenon* cf. *gracile* 29.2% del BV total de cianobacterias).

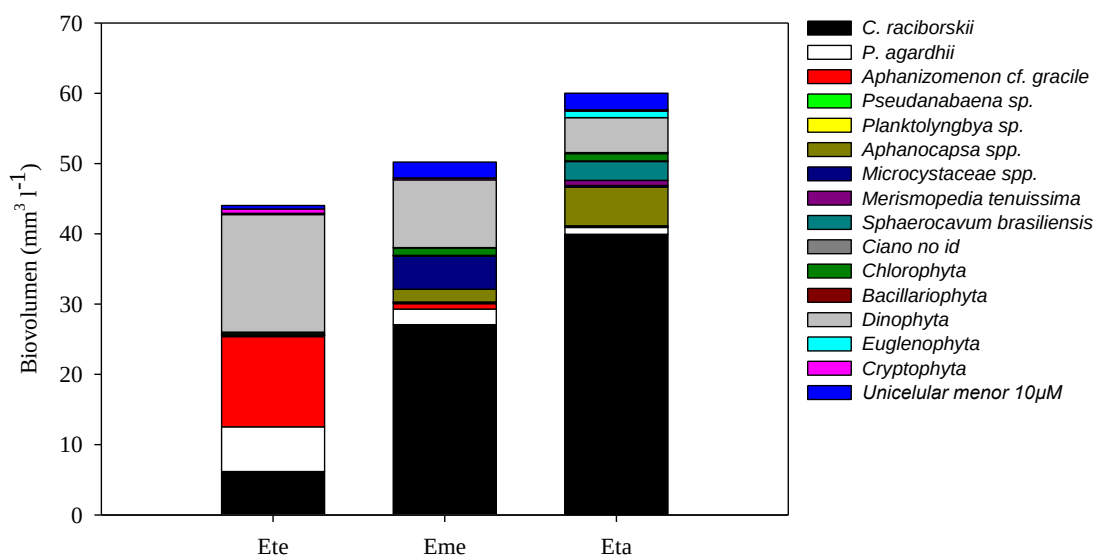


Figura 5. Biovolumen de fitoplancton registrado en cada muestreo. Se indica la contribución al biovolumen total de las especies de cianobacterias. Los muestreos son: Ete, estratificación temprana (Noviembre 2013), Eme, estratificación media (Febrero 2015) y Eta, estratificación tardía (Marzo 2014).

Cuando el BV de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Eme y Eta) tuvo mayor proporción en el BV total de fitoplancton, la contribución de las microalgas eucariotas al BV total fue menor en comparación con el muestreo realizado en Ete, donde predominaron *P. agardhii* y *A. cf. gracile* (Ete). En los muestreos de Eme y Eta aparecen especies del orden Chroococcales, principalmente representadas por *Microcystis* spp. y *Sphaerocavum brasiliensis* (**Fig. 5**). *Microcystis* spp. representaron 12.5% del BV total de cianobacterias en el muestreo de Eme, mientras que *Sphaerocavum brasiliensis* y *Microcystis* spp. representaron 5.8% del BV total de cianobacterias en el muestreo de Eta.

El diagrama obtenido del análisis de componentes principales se observa en la **Figura 6**. El 74.9% de la varianza de los datos fue explicado con los primeros dos autovalores (56% y 18.9% de la varianza, ejes 1 y 2 respectivamente). Las especies que aportaron más en sentido negativo al componente 1 fueron *Planktothrix agardhii* (-0.37) y *Aphanizomenon cf. gracile* (-0.39), mientras que en sentido positivo fueron *Cylindrospermopsis raciborskii* (0.38) y los organismos clasificados como menores a 10 µm (0.36). Evaluando los muestreos asociados a diferentes momentos de la

estratificación, el muestreo de Ete fue el que aportó más en sentido negativo al Comp.1, mientras que el de Eta fue el que aportó más en sentido positivo a este componente. Las especies que aportaron mas en sentido positivo al segundo componente del ACP fueron *Microcystis* spp. (0.60) y *Tetradron minumum* (0.58), mientras que en sentido negativo fueron *Merismopedia tenuissima* (-0.33) y *Aphanocapsa* spp. (-0.31). *P. agardhii* y *A cf. gracile* solo estuvieron asociadas al muestreo de Ete. Los individuos de *Microcystis* spp. sólo se observaron relacionados al muestreo de Eme, mientras que *M. tenuissima* y *Aphanocapsa* spp (ambas Synechococcales) se relacionaron al muestreo de Eta. *C. raciborskii* (Nostocal) se encontró asociada a los muestreos de Eme y Eta, y se mostró negativamente correlacionada con *P. agardhii* ($\rho=-0.81$) y *A. cf. gracile* ($\rho=-0.88$). Se observó una tendencia lineal negativa ($p<0.001$, $R^2=0.67$) del biovolumen de las cianobacterias en función de la concentración de PT, explicada mayormente por la contribución de *C. raciborskii* ($p<0.001$, $R^2=0.69$).

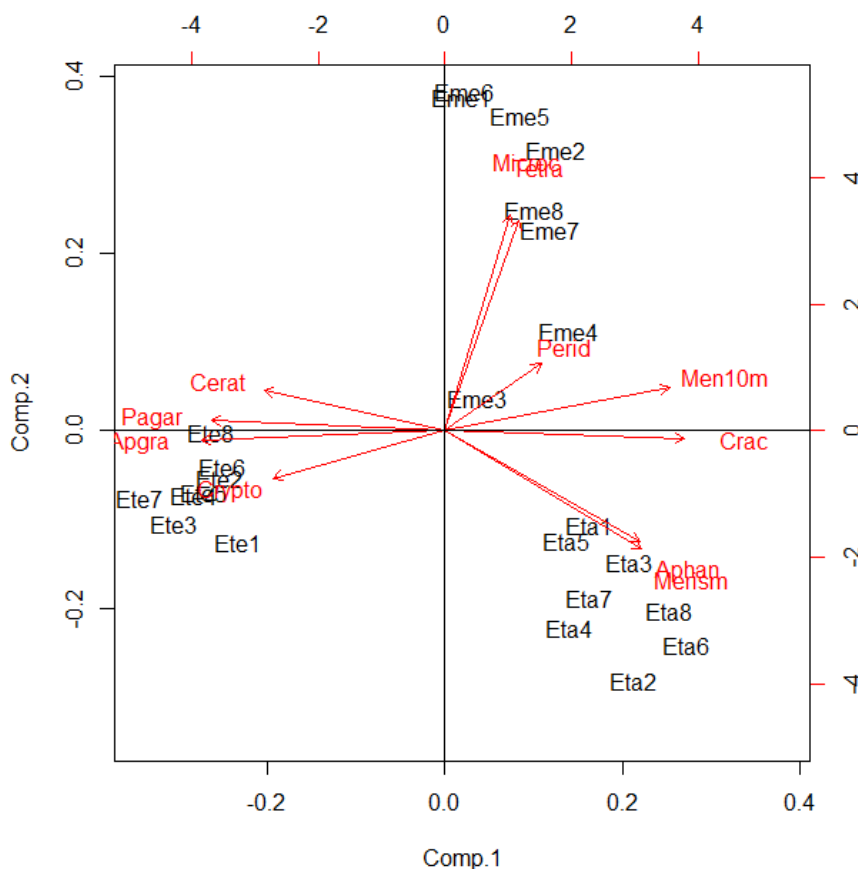


Figura 6. Diagrama del análisis de componentes principales (ACP) (Comp.: componente). Las especies representadas son aquellas que superaron el 1% del biovolumen total del fitoplancton. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Crac), *Aphanizomenon cf. gracile* (Apgra), *Planktothrix agardhii* (Pagar), *Aphanocapsa* spp. (Aphan), *Merismopedia tenuissima* (Merism), *Cryptomonas* spp. (Crypto), *Peridinium* sp. (Perid), *Ceratium hirudinella* (Cerat), *Tetradron minumum* (Tetra), *Microcystis* spp. (Microc), Células menores a 10 µm (Men10m).

4.2. Objetivo específico 2. Analizar el efecto de diferentes t_E al fosfato y la disponibilidad de nitrato en la tasa de crecimiento de las especies dominantes de cianobacterias.

En ambos experimentos (A y B) hubo una estimulación del crecimiento (DO) de la comunidad de fitoplancton en respuesta a la adición de nutrientes (**Fig. 7**). Sin embargo, la respuesta fue más evidente en el experimento A, y principalmente en los tratamientos +N, triplicando su biomasa en los primeros 5 días del experimento. En los tratamientos -N del experimento A también se encontró una respuesta significativa en el incremento de la biomasa a la adición de nutrientes, ya que casi triplicó la biomasa original en los primeros 5 días. En el experimento B, la respuesta de la biomasa de fitoplancton fue significativa en los tratamientos con +N, pero no en los -N (**Fig. 7**).

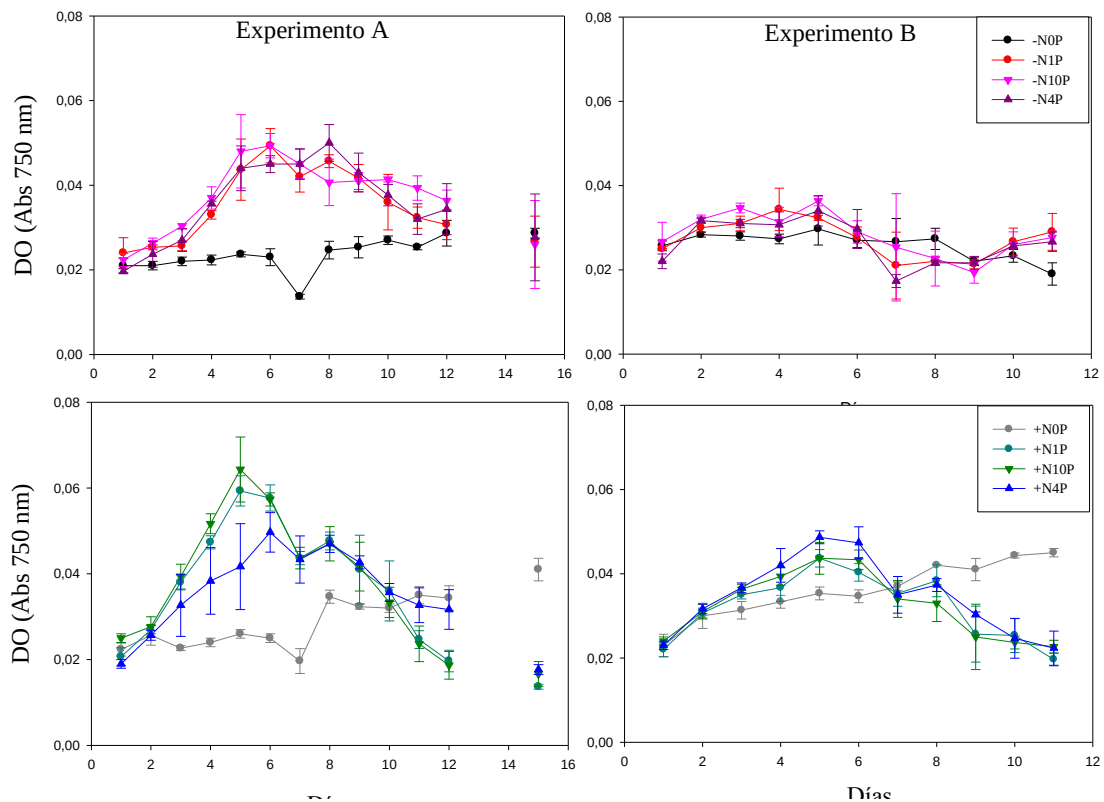


Figura 7. Variación de la densidad óptica (DO) como indicador de biomasa en función de los días para ambos experimentos. A la izquierda el experimento A (Nov. 2013, Ete, adición de 10 μM de P) y a la derecha el experimento B (Feb. 2015, Eme, adición de 33 μM de P). Arriba: tratamientos sin Nitrógeno (-N) con su control (0P) y los tres patrones de pulsos de P aplicados (1P, 4P y 10P). Abajo: tratamientos con Nitrógeno (+N) con su control (0P) y los tres patrones de pulsos de P aplicados (1P, 4P y 10P).

En el experimento A las tasas de crecimiento de la comunidad de fitoplancton fueron significativamente mayores en los tratamientos +P (1P, 4P y 10P) en comparación con los controles (0P) para cualquiera de los tratamientos de N ($p < 0.05$) (**Fig. 8**). Tanto en los tratamientos +N como en los -N la mayor tasa de crecimiento se registró en el tratamiento de 10P ($p < 0.05$), que corresponde al mayor tiempo de exposición al nutriente. Para el caso del experimento B no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes t_E utilizados ni en los diferentes tratamientos de N.

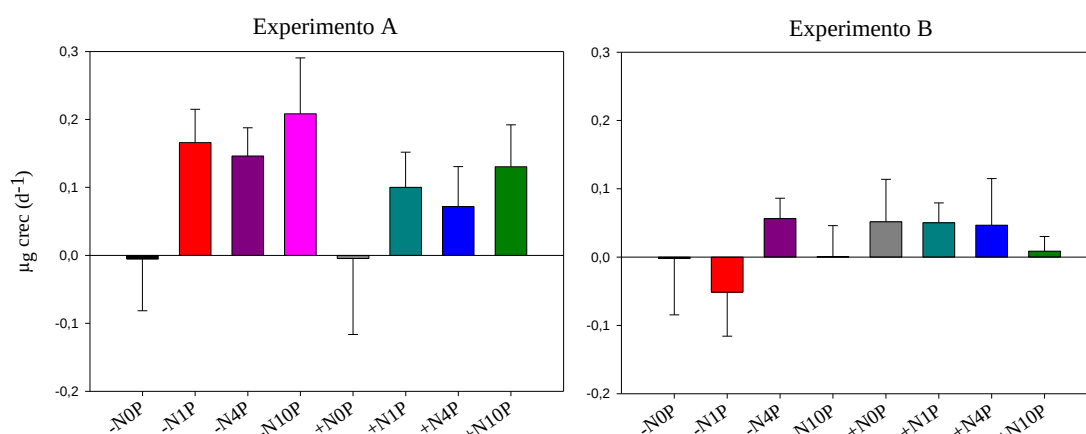


Figura 8. Tasas de crecimiento globales ($\mu\text{g}_{\text{crec}}$) de la comunidad de fitoplancton estimadas a partir del biovolumen y para cada tratamiento (color de barras diferentes). A la izquierda el experimento A y a la derecha el experimento B.

Tabla 3. Concentraciones iniciales y finales de nutrientes disueltos y totales (promedio $\pm$ desvío estándar) para ambos experimentos, **Exp A**, 10 μM -Nov 2013 (Ete) y **Exp B**, 33 μM -Feb 2015 (Eta): Amonio (NH_4^+), Nitrito (NO_2^-), Nitrato (NO_3^-) y fósforo reactivo soluble (PRS), Nitrógeno total (NT) y Fósforo total (PT). Se indican las relaciones estequiométricas de Redfield para los nutrientes totales (NT:PT) y disueltos (NID:PRS). LD: límite de detección.

		$\text{NH}_4^+ (\mu\text{g l}^{-1})$	$\text{NO}_2^- (\mu\text{g l}^{-1})$	$\text{NO}_3^- (\mu\text{g l}^{-1})$	PRS ($\mu\text{g l}^{-1}$)	NT ($\mu\text{g l}^{-1}$)	PT ($\mu\text{g l}^{-1}$)	NT:PT	NID:PRS
Exp. A	INICIO. exp	26 ± 18	<LD	82 ± 9	14 ± 1	2327 ± 172	78 ± 2	66	17
	-N0P	19 ± 13	<LD	<LD	<LD	1396 ± 732	61 ± 5	51 ± 27	36 ± 0
	-N1P	20 ± 5	<LD	82 ± 35	112 ± 19	4541 ± 573	536 ± 113	19 ± 6	2 ± 0

	-N4P	21 ± 4	<LD	50 ± 23	149 ± 27	2773 ± 1405	476 ± 32	12 ± 5	1 ± 0
	-N10P	15 ± 2	<LD	58 ± 7	126 ± 15	3748 ± 856	580 ± 5	14 ± 3	1 ± 0
	+N0P	7 ± 6	19 ± 1	5417 ± 1436	<LD	9998 ± 808	62 ± 2	352 ± 17	5718 ± 2186
	+N1P	151 ± 46	62 ± 2	5417 ± 714	78 ± 19	8602 ± 1467	422 ± 104	46 ± 12	168 ± 65
	+N4P	125 ± 109	65 ± 0	4630 ± 0	175 ± 34	4693 ± 37	667 ± 50	28 ± 21	80 ± 0
	+N10P	188 ± 73	71 ± 8	5291 ± 544	114 ± 37	5690 ± 4505	442 ± 29	30 ± 21	119 ± 55
Exp. B	INICIO. exp	16 ± 6	<LD	<LD	<LD	1931 ± 488	76 ± 3	56	14
	-N0P	37 ± 19	<LD	72 ± 18	<LD	2215 ± 282	62 ± 2	84 ± 10	33 ± 10
	-N1P	13 ± 5	<LD	69 ± 10	664 ± 4	2524 ± 790	919 ± 33	6 ± 1	1 ± 0
	-N4P	12 ± 0	<LD	65 ± 15	686 ± 21	2712 ± 538	897 ± 29	6 ± 1	1 ± 0
	-N10P	15 ± 2	<LD	66 ± 12	686 ± 30	2887 ± 510	986 ± 46	6 ± 0	1 ± 0
	+N0P	13 ± 2	22 ± 2	5717 ± 988	<LD	12692 ± 1678	62 ± 2	452 ± 62	1309 ± 406
	+N1P	119 ± 23	57 ± 17	5826 ± 353	311 ± 52	13297 ± 1837	773 ± 52	38 ± 6	43 ± 9
	+N4P	127 ± 13	69 ± 9	4676 ± 336	343 ± 83	10969 ± 188	806 ± 44	30 ± 1	32 ± 7
	+N10P	126 ± 56	59 ± 31	5018 ± 679	247 ± 89	12964 ± 228	782 ± 57	36 ± 2	49 ± 13

Al inicio de los experimentos el fitoplancton se encontraba limitado potencialmente por fósforo, de acuerdo al cociente atómico NT:PT (66 y 56, experimentos A y B, respectivamente) (**Tabla 3**). En el final del experimento A, el tratamiento -N1P tuvo mayor concentración de NT respecto a su control (-N0P) ($p < 0.05$). En el experimento B solo se registraron diferencias significativas esperables entre – y +N ($p < 0.05$) (**Tabla 3**). Otro aspecto a destacar es que en el experimento B, en el que se añadió una concentración de saturación de P, se obtuvo un cociente atómico NT:PT de 6 en los tratamientos -N (**Tabla 3**).

La comunidad de fitoplancton varió en su biovolumen total y composición a lo largo de los experimentos (**Tabla 4**). En el experimento A, y al final de la fase exponencial, se registraron diferencias significativas en el biovolumen total entre los tratamientos. El

factor que resultó significativo fue el P ($p<0.001$) ya que en los tratamientos -N como en los +N, el biovolumen total de fitoplancton fue significativamente mayor en los tratamientos +P con respecto al tratamiento control (0P). La contribución relativa de cianobacterias no mostró diferencias significativas en la fase exponencial del experimento A (**Tabla 4**).

Tabla 4. Biovolumen total de fitoplancton (BV, mm^3l^{-1}) y proporción de cianobacterias expresada como % para cada tratamiento y cada experimento (Experimento A, 10 μM -Ete, y experimento B, 33 μM -Ete) en tiempo inicial, al final de la fase exponencial y al final de los experimentos.

		-N0P	-N1P	-N4P	-N10P	+N0P	+N1P	+N4P	+N10P
Exp. A	BV inicio (mm^3l^{-1})	51.7±14.5	35.8±6.2	44.9±7.4	28.9±12.4	45.9±7.23	46.2±15.8	61.4±17.7	37.3±6.6
	% Cianobacterias	60.1	66.2	57.7	64.0	53.8	55.2	49.8	66.5
	BV exponencial (mm^3l^{-1})	48.9±3.8	81.5±7.2	93.2±14.8	77.1±3.1	46.9±18.8	73.5±8.0	85.9±11.2	72.1±16.7
	% Cianobacterias	54.5	68.9	63.4	82.5	68.7	87.5	69.6	74.7
	BV final (mm^3l^{-1})	21.0±6.4	22.1±3.3	27.6±13.6	22.1±10.9	28.1±2.9	11.4±3.7	18.1±1.2	8.22±1.91
	% Cianobacterias	93.3	79.7	81.8	88.8	94.1	73.7	72.5	68.1
Exp. B	BV inicio (mm^3l^{-1})	65.0±17.5	65.6±7.3	38.3±5.5	48.4±9.9	41.1±9.1	43.1±9.4	43.8±2.3	56.1±9.1
	% Cianobacterias	64.7	64.2	81.7	73.9	89.5	75.4	47.3	74.9
	BV exponencial (mm^3l^{-1})	64.3±16.6	51.3±11.1	50.6±5.7	47.9±2.6	65.1±16.1	55.3±11.9	57.4±19.7	58.1±4.7
	% Cianobacterias	67.9	71.6	86.8	93.2	86.4	72.5	84.3	89.6
	BV final (mm^3l^{-1})	23.6±4.9	50.8±27.0	33.3±7.1	39.7±18.4	94.7±48.4	183.9±55.4	73.2±9.9	45.4±18.4
	% Cianobacterias	83.6	72.4	74.4	68.3	92.1	80.0	60.3	40.2

Para el experimento A, el biovolumen de fitoplancton fue significativamente mayor al final de la fase exponencial con respecto al inicio en todos los tratamientos +N y -N con adición de P ($p<0.05$). En la etapa final, el BV de fitoplancton fue significativamente mayor en los tratamientos +N y el control (+N0P) que lo registrado en los tratamientos de 1P y 10P ($p<0.05$), mientras que en los tratamientos -N no se registraron diferencias significativas. La proporción de cianobacterias en el BV total de fitoplancton aumentó significativamente con respecto al inicio ($p<0.05$), y a su vez en los tratamientos +N con respecto a los -N ($p<0.05$). En el tiempo final, la proporción de cianobacterias fue

significativamente mayor en los tratamientos -N con respecto a los +N ($p < 0.05$). No se registraron diferencias significativas en la proporción de cianobacterias en los tratamientos -N entre los diferentes patrones de pulsos de P. De los tratamientos +N, el control (0P) presentó una contribución de cianobacterias al BV total significativamente mayor a los tratamientos con adición de P (1P, 4P y 10P).

Para el caso del experimento B, se detectaron diferencias significativas entre el BV de los tratamientos control (0P) y en los tratamientos 1P entre - y +N al inicio del experimento. En la condición -N el BV de fitoplancton fue mayor que en +N ($p < 0.05$). La contribución relativa de cianobacterias al inicio del experimento fue similar en todos los tratamientos. Al final de la fase exponencial del experimento B no se detectaron diferencias significativas en el BV de fitoplancton pero sí en la proporción de cianobacterias, siendo el porcentaje de cianobacterias en los tratamientos con 10P significativamente mayor al registrado en los tratamientos de 1P ($p < 0.05$). Al final del experimento B el BV de fitoplancton fue significativamente mayor en los tratamientos +N con respecto a los -N ($p < 0.05$). A su vez, en los tratamientos +N, el tratamiento 1P fue el que registró mayor BV de fitoplancton con respecto a las otras condiciones de P (4P y 10P) y al control (0P). Sin embargo, en los tratamientos +N la contribución relativa de cianobacterias al BV total de fitoplancton fue significativamente mayor en el control (0P) y en el tratamiento 1P, respecto al 4 y 10P ($p < 0.05$).

Mediante el análisis de las tasas de crecimiento de cada orden de cianobacterias se pudieron observar diferentes respuestas frente a la misma forma de adición de nutrientes. En el experimento A (**Fig. 9**), el BV de las Nostocales creció a tasas similares en los tratamientos -N y +N, y dentro de los tratamientos -N las tasas de crecimiento en la fase exponencial fueron significativamente mayores en los tratamientos +P en comparación con los controles (0P). Sin embargo cabe destacar que en los controles, -N0P y +N0P se registraron μcrec muy bajas pero positivas, (0.014 d^{-1} y 0.097 d^{-1} N0P y +N0P, respectivamente). En relación al BV de las Oscillatoriales, el factor significativo también fue el P. Las tasas de crecimiento en la fase exponencial fueron significativamente mayores en los tratamientos con adición de P en comparación al control (0P), independientemente de la adición o no de N. Las Oscillatoriales registraron μcrec negativas en los tratamientos control (-N0P y +N0P). Para los otros dos órdenes, Synechococcales y Chroococcales, no se registraron diferencias

significativas en las μ_{exp} entre los tratamientos y controles. En los tratamientos control, Nostocales fue el único grupo que presentó tasas de crecimiento en fase exponencial positivas ($p < 0.05$). En los tratamientos de 10P, tanto en -N como en +N, las tasas de crecimiento de las Nostocales y las Oscillatoriales fueron similares y significativamente más altas que las de los otros dos grupos (Synechococcales y Chroococcales). La determinación de la tasa de crecimiento en fase tardía ($\mu_{tarOrden}$) reveló también diferencias entre los órdenes Nostocales y Oscillatoriales. Para las Nostocales se registraron tasas de crecimiento tardías negativas y mayores en los tratamientos +N con respecto a los -N y a su vez con los tratamientos con adición de P (1P, 4P y 10P) con respecto a los controles (0P) ($p < 0.05$). En el caso de las Oscillatoriales las $\mu_{tarOrden}$ también fueron significativamente mayores en +N, pero en referencia al P, las tasas en los controles -N0P y +N0P fueron positivas (0.067 d^{-1} y 0.087 d^{-1} respectivamente) y en los tratamientos con adición de P (1P, 4P y 10P) fueron negativas, pero sin diferencias significativas entre ellas. En el tratamiento -N10P no se registraron diferencias significativas en la μ_{tar} entre órdenes, pero en los tratamientos -N1P y -N4P el biovolumen de las Nostocales fue el que decayó más rápidamente ($p < 0.05$). En relación a los tratamientos con nitrógeno y con fósforo las poblaciones de las Nostocales también son las que disminuyen su BV con mayor velocidad que el resto de los órdenes ($p < 0.05$).

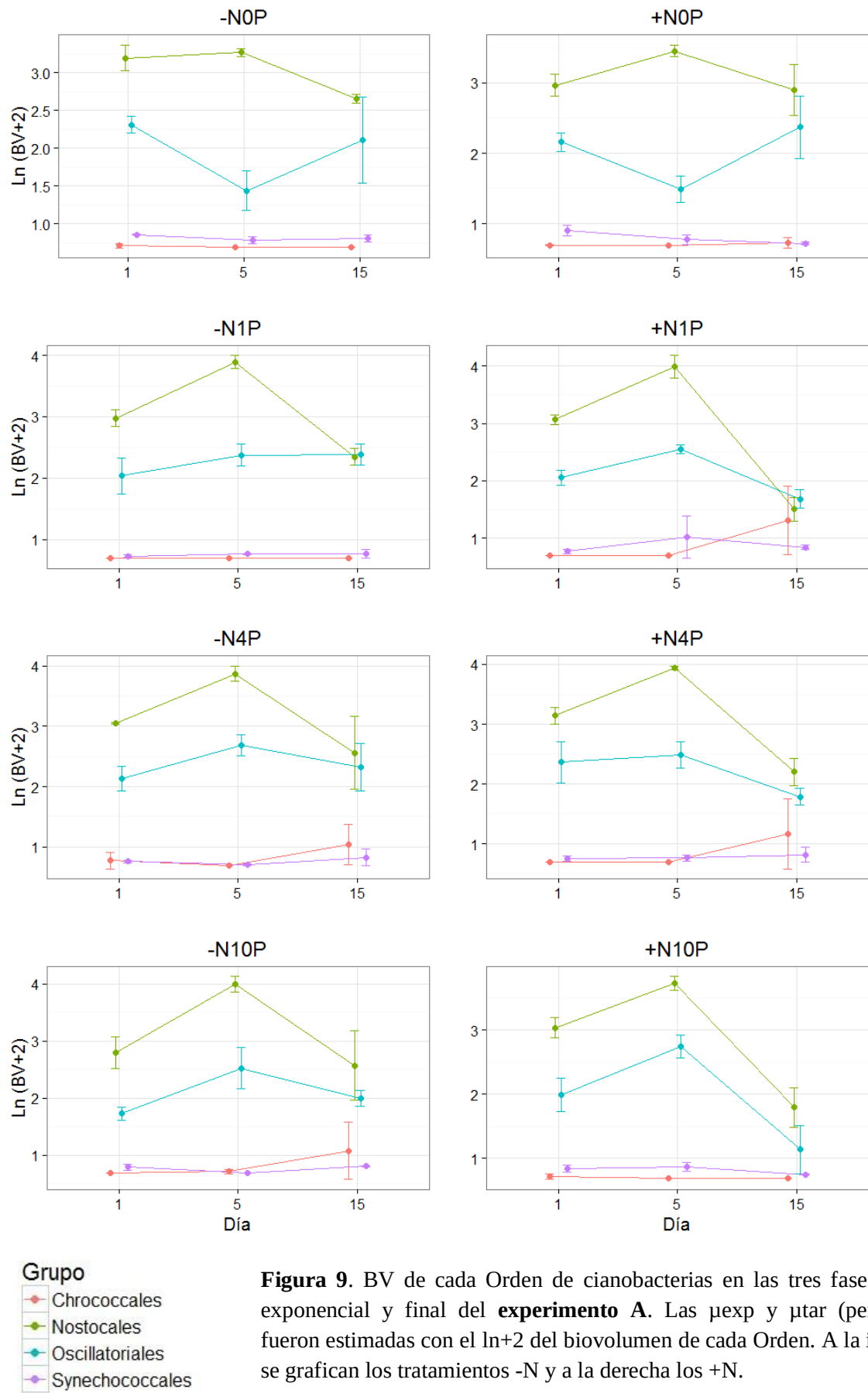


Figura 9. BV de cada Orden de cianobacterias en las tres fases: inicio, exponencial y final del **experimento A**. Las μ_{exp} y μ_{tar} (pendientes) fueron estimadas con el $\ln+2$ del biovolumen de cada Orden. A la izquierda se grafican los tratamientos -N y a la derecha los +N.

El análisis de las tasas de crecimiento de los Órdenes de cianobacterias del experimento B (**Fig.10**) permitió observar respuestas diferentes y más complejas en comparación con el experimento A. En el experimento B, la tasa de crecimiento en la fase exponencial (μ_{exp}) de las poblaciones de Nostocales y Chroococcales no varió significativamente entre los tratamientos. La tasa de crecimiento de las Oscillatoriales fueron positivas en los tratamientos +N en comparación con los -N, que fueron negativas ($p<0.05$). El análisis de comparación entre Órdenes dentro de cada tratamiento indicó que en los tratamientos +N no hay diferencias significativas en la μ_{exp} . Sin embargo, en los tratamientos sin nitrógeno y con 4P y 10P, las poblaciones de las Nostocales crecieron significativamente a una velocidad mayor que el resto de los grupos ($p<0.05$). En la segunda etapa del experimento (crecimiento tardío, μ_{tar}), las Nostocales exhibieron una tasa negativa mayor en condiciones de +N y en los tratamientos con adición de P (1P, 4P y 10P) en comparación con el control ($p<0.05$). En el caso de las Chroococcales las pendientes fueron positivas en la fase de crecimiento tardío, y significativamente mayores en los tratamientos +N en comparación con los -N ($p<0.05$). Dentro de cada tratamiento, el -N4P fue el único en el que se detectaron diferencias significativas, en el que las poblaciones de las Nostocales exhibieron tasas negativas y las de las Chroococcales positivas ($p<0.05$). En los tratamientos +N, con 1P y 4P los organismos del grupo Chroococcales fueron el único grupo con una pendiente positiva y significativamente diferente al resto de los grupos que tuvieron pendientes negativas.

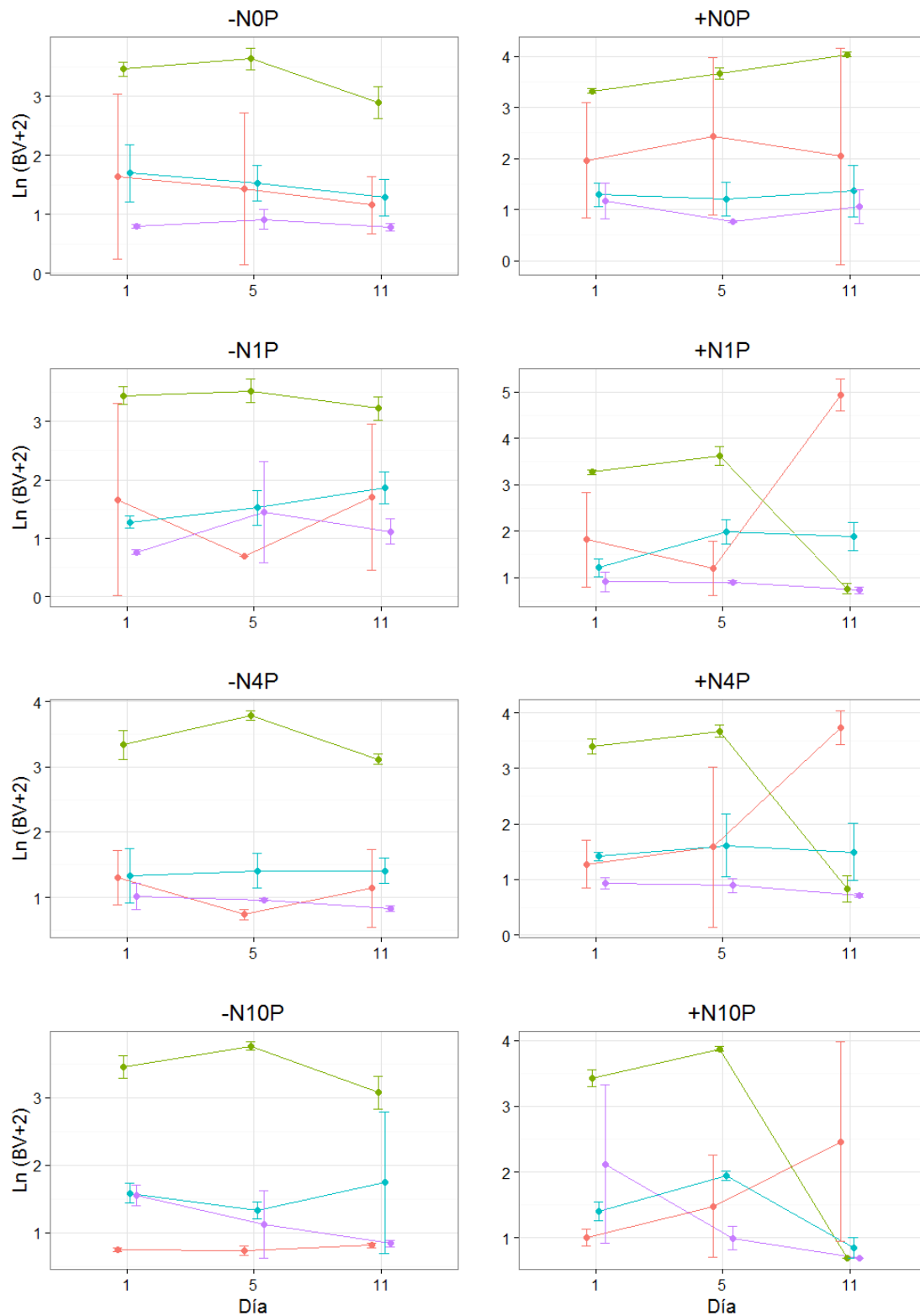


Figura 10. BV de cada orden de cianobacterias en las tres fases: inicio, exponencial y final del **experimento B**. Las μ_{exp} y μ_{tar} (pendientes) fueron estimadas con el $\ln$ del biovolumen de cada orden. A la izquierda se grafican los tratamientos -N y a la derecha los +N.

A nivel específico se determinaron las tasas de crecimiento en fase exponencial y tardía (μ_{exp} y μ_{tar} respectivamente) de las especies dominantes de la comunidad de fitoplancton: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix agardhii*, *Aphanizomenon cf. gracile* y especies no identificadas de la familia Microcystaceae (**Fig. 11**).

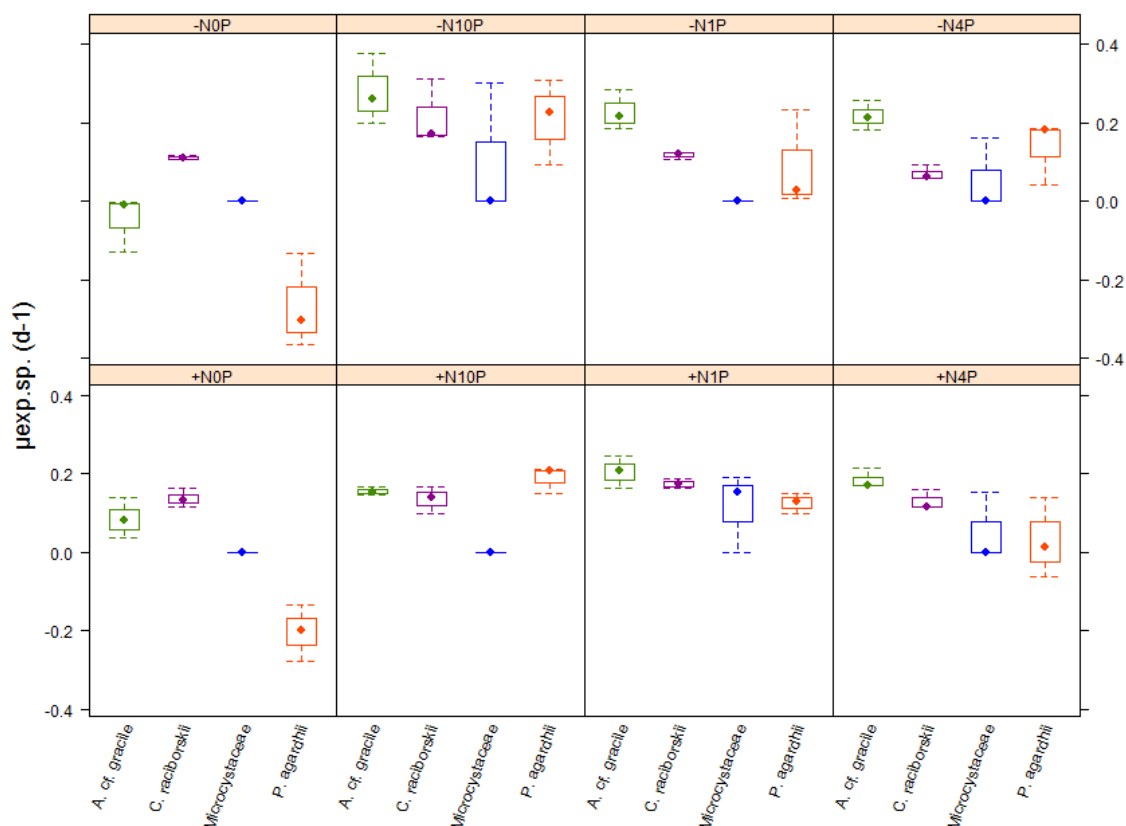


Figura 11. Tasas de crecimiento específicas en fase exponencial ($\mu_{exp,sp}$, d^{-1}) para el Experimento A de las cuatro especies dominantes: *Aphanizomenon cf. gracile* (verde), *Cylindrospermopsis raciborskii* (violeta), especies de la familia Microcystaceae (azul) y *Planktothrix agardhii* (naranja).

En el experimento A, la máxima tasa de crecimiento registrada para las especies dominantes, excepto las especies agrupadas en la familia Microcystaceae, fue en los tratamientos de 10P, que correspondió al mayor tiempo de exposición al fósforo ($p < 0.05$). A su vez, cabe destacar que en condiciones de deficiencia por fósforo (tratamientos 0P), *C. raciborskii* y *A. cf. gracile* exhibieron tasas de crecimiento positivas, mientras que *P. agardhii* tuvo tasas negativas ($p < 0.001$) (**Fig. 11**). En el

experimento B, el efecto de la adición de nutrientes en las tasas de crecimiento específicas fue variable entre las especies. Sin embargo, en los tratamientos control (0P) se registró la misma tendencia que en el experimento A donde *C. raciborskii* presentó tasas de crecimiento positivas y *P. agardhii* negativas (**Fig. 12**).

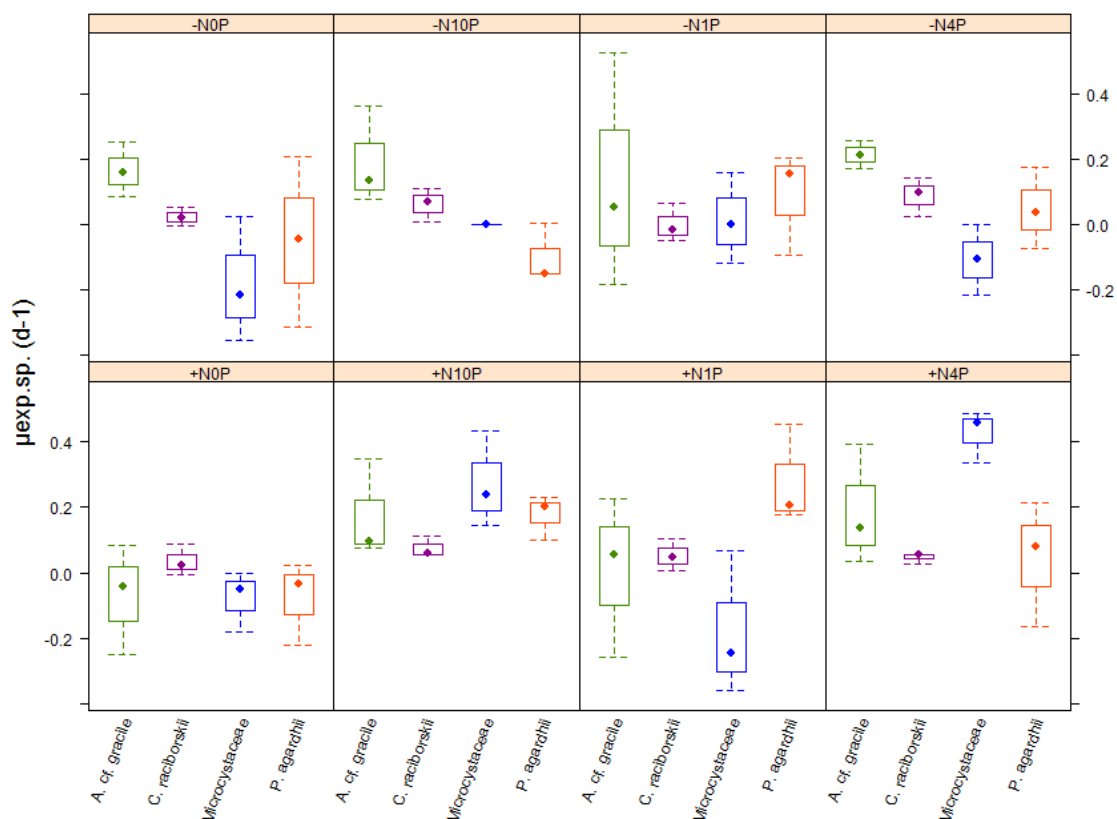


Figura 12. Tasas de crecimiento específicas en fase exponencial ($\mu_{exp.sp.}$, d^{-1}) para el Experimento B de las cuatro especies dominantes: *Aphanizomenon cf. gracile* (verde), *Cylindrospermopsis raciborskii* (violeta), especies de la familia Microcystaceae (azul) y *Planktothrix agardhii* (naranja).

En la segunda etapa, donde se estimó la $\mu_{tar.sp.}$, se observaron diferencias significativas entre *C. raciborskii* y *P. agardhii* en el experimento A. En los tratamientos control la μ_{tar} de *C. raciborskii* fue negativa y la de *P. agardhii* fue positiva. En los tratamientos con adición de P, la $\mu_{tar.sp.}$ de *C. raciborskii* fue mayor que la de *P. agardhii*. Otro aspecto a destacar es que las especies de la familia Microcystaceae exhibieron $\mu_{tar.sp.}$ positivas en los tratamientos +N y con adición de P (**Fig.13**).

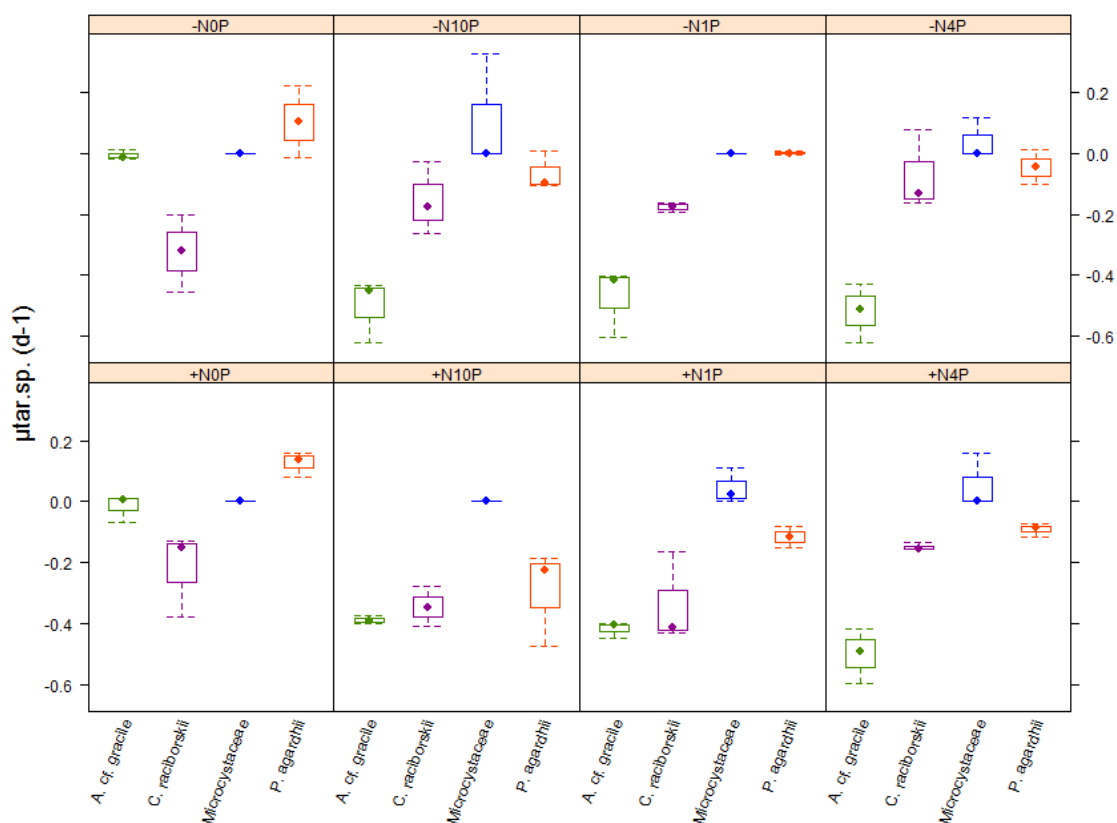


Figura 13. Tasas de crecimiento tardías específicas ($\mu_{tar.sp}$, d^{-1}) para el Experimento A de las cuatro especies dominantes: *Aphanizomenon cf. gracile* (verde), *Cylindrospermopsis raciborskii* (violeta), especies de la familia Microcystaceae (azul) y *Planktothrix agardhii* (naranja).

En el caso del experimento B, las especies registraron grandes variaciones en las μ_{tar} . A diferencia del experimento A, no se observaron diferencias significativas entre las $\mu_{tar.sp}$ de *C. raciborskii* y *P. agardhii* en los tratamientos control (0P). En los tratamientos sin -N y con adición de P *A. cf. gracile* exhibió $\mu_{tar.sp}$ positivas, lo que implica un incremento de biomasa en esta segunda fase del experimento. Las especies de la familia Microcystaceae fueron las que registraron tasas positivas más altas en los tratamientos +N y con adición de P, mientras que *C. raciborskii* fue la especie que disminuyó su biovolumen a una mayor velocidad (**Fig. 14**).

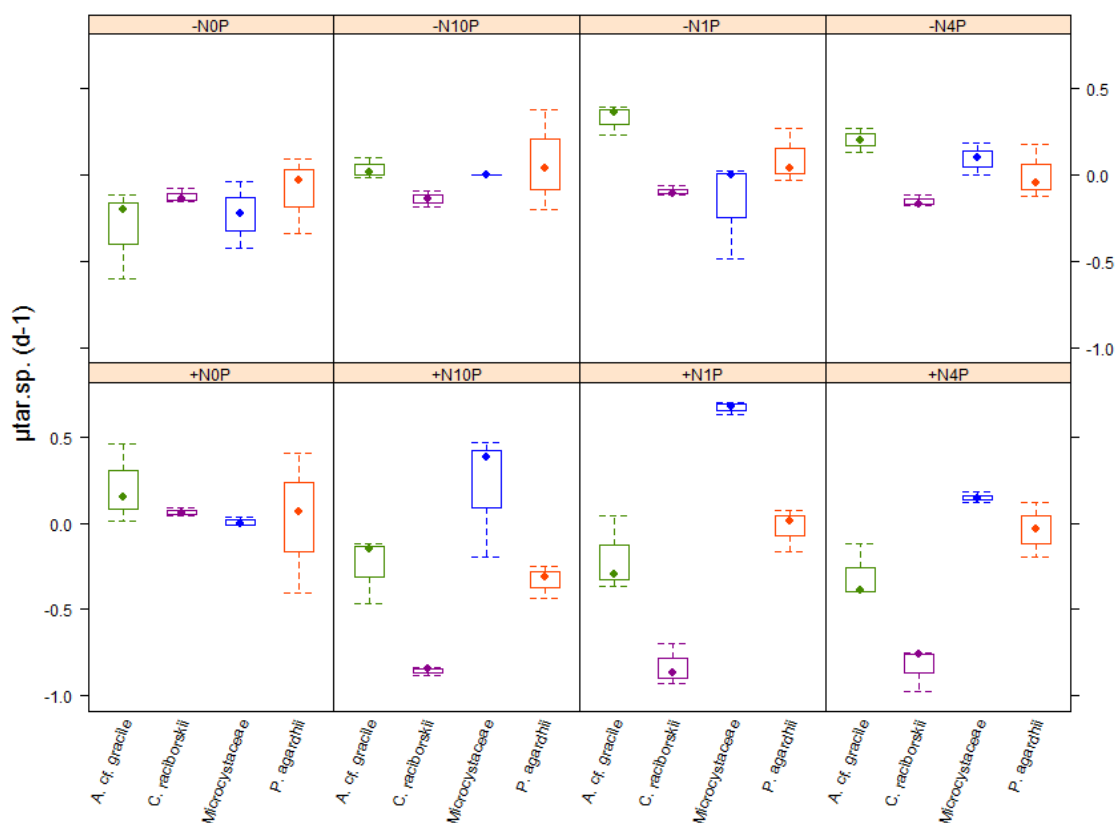


Figura 14. Tasas de crecimiento tardías específicas ($\mu_{tar,sp}$, d^{-1}) para el Experimento B de las cuatro especies dominantes: *Aphanizomenon cf. gracile* (verde), *Cylindrospermopsis raciborskii* (violeta), especies de la familia Microcystaceae (azul) y *Planktothrix agardhii* (naranja).

4.3. Objetivo específico 3. Analizar si el estado nutricional de las cianobacterias influye en la producción de toxinas: saxitoxinas (STX) y microcistinas (MYC).

Saxitoxinas (STX):

Al inicio de los experimentos la concentración de saxitoxina, [STX], por unidad de volumen y la concentración estandarizada por el BV de fitoplancton fue mayor en el experimento B que en el A. A su vez, la concentración de toxina al final del experimento B realizado durante el período Eme fue mayor a la detectada al final del experimento A (**Tabla 5**). En el experimento A la [STX] fue mayor al final con respecto

al inicio del mismo en los tratamientos control (-N0P y +N0P) y en los tratamientos -N4P y -N10P. En el caso del experimento B, la [STX] fue mayor al final con respecto al inicio en todos los tratamientos.

Tabla 5. Concentración de STX, [STX], determinada a partir de ELISA para el inicio y final de cada experimento (A y B). Asimismo se indica la tasa de cambio (Δ) entre el final y el inicio de ambos experimentos de la concentración de STX estandarizada por el biovolumen de cianobacterias totales, BV_{ciano} .

	Noviembre 2013 (Exp A, Ete)		Febrero 2015 (Exp B, Eme)	
	[STX] (ng ml ⁻¹)	Δ [STX]/ BV_{ciano}	[STX] (ng ml ⁻¹)	Δ [STX]/ BV_{ciano}
INICIO	1.06		4.34	
-N0P	1.71 $\pm$ 0.42	2.22 $\pm$ 0.84	7.34 $\pm$ 0.50	3.24 $\pm$ 0.41
-N1P	1.03 $\pm$ 0.11	1.45 $\pm$ 0.32	4.95 $\pm$ 0.47	1.30 $\pm$ 0.56
-N4P	1.07 $\pm$ 0.10	1.36 $\pm$ 0.62	4.61 $\pm$ 0.69	1.63 $\pm$ 0.44
-N10P	1.16 $\pm$ 0.08	1.66 $\pm$ 0.75	8.14 $\pm$ 0.25	3.00 $\pm$ 1.45
+N0P	1.88 $\pm$ 0.26	1.73 $\pm$ 0.39	4.39 $\pm$ 0.47	0.57 $\pm$ 0.20
+N1P	0.89 $\pm$ 0.02	2.86 $\pm$ 1.23	5.79 $\pm$ 0.44	0.36 $\pm$ 0.14
+N4P	1.01 $\pm$ 0.11	1.88 $\pm$ 0.40	6.52 $\pm$ 0.46	1.31 $\pm$ 0.37
+N10P	1.02 $\pm$ 0.10	5.34 $\pm$ 3.28	6.74 $\pm$ 0.64	2.16 $\pm$ 0.82

Para el experimento A se detectó STX en el agua en tiempo inicial ([STX]/ BV_{ciano} : 41.35 ng mm⁻³). Al final del experimento se registró un aumento de [STX]/ BV_{ciano} en todos los tratamientos. Los tratamientos en los que se registró una tasa de cambio (Δ [STX]/ BV_{ciano}) significativa fueron los tratamientos +N con respecto a -N ($p < 0.05$). De los tratamientos +N, la [STX] en 10P fue la que registró la mayor variación con respecto al inicio del experimento ($p < 0.05$). Al inicio del experimento B la [STX] por unidad de BV_{ciano} fue de 117.54 ng mm⁻³. Al final del experimento B ocurrió que en todos los tratamientos se registró una mayor [STX]/ BV_{ciano} con respecto al inicio, del mismo modo que en el experimento A. Sin embargo, en los tratamientos -N del experimento B fue donde se registró Δ de toxina mayor con respecto a los +N ($p < 0.05$). Dentro de los tratamientos de P, el 10P, tanto en +N como en -N, fue donde se registró la mayor amplitud de cambio en la [STX]/ BV_{ciano} , al igual que el experimento A ($p < 0.05$).

Se encontró una relación lineal positiva y significativa entre la concentración de STX con el biovolumen de *C. raciborskii* de ambos experimentos ($R^2=0.66$, $p<0.001$) (**Fig. 12**).

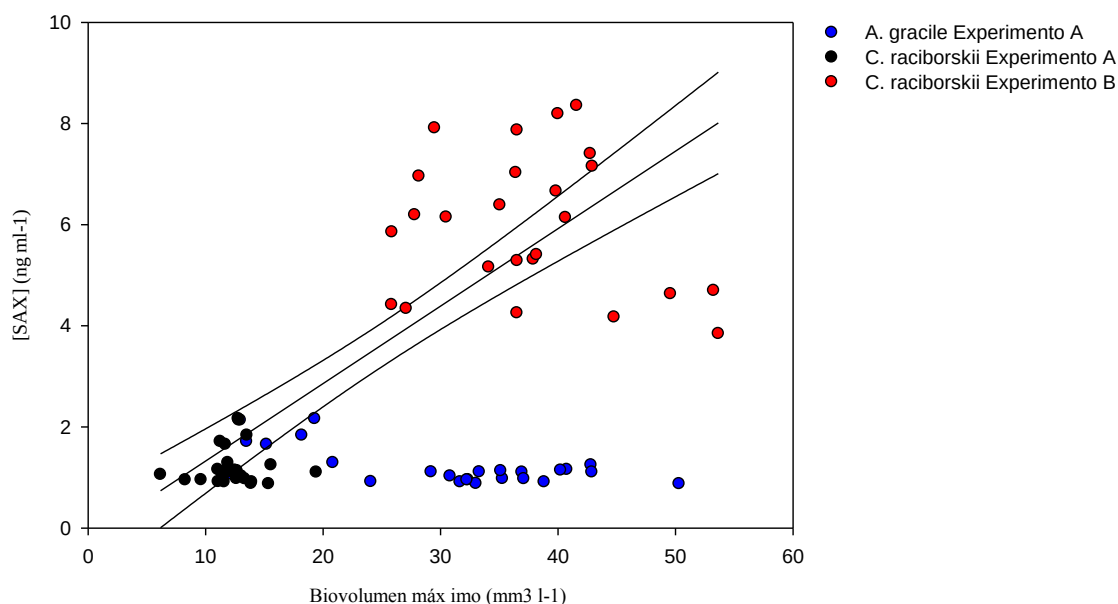


Figura 12. Biovolumen máximo de las especies potencialmente productoras de saxitoxina, *C. raciborskii* y *A. cf. gracile*, en relación a la concentración de saxitoxina. Se indica el modelo lineal, y los intervalos de confianza, ajustado únicamente con los datos de *C. raciborskii* y los intervalos de confianza.

Microcistinas (MYC):

En ambos experimentos la concentración de MYC, [MYC], inicial, se encontró próxima o por debajo del límite de detección ($<0.3 \mu\text{g l}^{-1}$) del método utilizado (**Tabla 6**). Al final del experimento A, la [MYC] aumentó significativamente con respecto al inicio en todos los tratamientos +N, mientras que en los tratamientos -N, salvo en el tratamiento control, no se detectó MYC. Para el caso del experimento B se registró un patrón similar al experimento A. La [MYC] al final del experimento fue mayor en los tratamientos +N y a su vez en los tratamientos de mayor tiempo de exposición al P, como el 4P y el 10P, mientras que en los -N fue casi indetectable (0P) o no detectable, excepto en el tratamiento de 10P.

Tabla 6. Concentración de MYC, [MYC] (ng ml⁻¹) para el inicio y final de cada experimento (A y B). El dato de INICIO corresponde a la concentración de toxina en el lago. Asimismo se indica la tasa de cambio (Δ) entre el final y el inicio de ambos experimentos de la concentración de MYC estandarizada por el biovolumen de cianobacterias registrado, BV_{ciano}. nd: no detectable (limite de detección: 0.3 μ g l⁻¹).

	Noviembre 2013 (Exp A, Ete)		Febrero 2015 (Exp B, Eme)	
	[MYC] (ng ml ⁻¹)	Δ [MYC]/BV _{ciano}	[MYC] (ng ml ⁻¹)	Δ [MYC]/BV _{ciano}
INICIO	0.37		Nd	
-N-P	0.39 $\pm$ 0.15	1.48 $\pm$ 0.83	0.37 $\pm$ 0.08	4686.8 $\pm$ 995.2
-N1P	Nd	0	Nd	0
-N4P	Nd	0	Nd	0
-N10P	Nd	0	1.08 $\pm$ 0.36	11004.1 $\pm$ 5537.1
+N-P	0.64 $\pm$ 0.25	1.64 $\pm$ 0.52	Nd	0
+N1P	0.54 $\pm$ 0.05	4.71 $\pm$ 1.58	Nd	264.6 $\pm$ 458.3
+N4P	0.20 $\pm$ 0.35	1.01 $\pm$ 1.75	1.38 $\pm$ 0.17	8132.4 $\pm$ 2537.2
+N10P	0.48 $\pm$ 0.05	7.15 $\pm$ 4.34	1.15 $\pm$ 0.55	13955.3 $\pm$ 3854.7

El mayor Δ [MYC]/BV_{ciano} fue registrado en el tratamiento +N10P en ambos experimentos. En el experimento A la tasa de cambio fue significativamente mayor en los tratamientos +N con respecto a los -N ($p < 0.05$) y a su vez en los tratamientos de 10P ($p < 0.05$). En el experimento B, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de N, pero sí en los diferentes t_E al P, en el cual la mayor tasa de cambio se registró en los tratamientos de 10P ($p < 0.05$). A su vez la mayor tasa de cambio se encontró asociada a la máxima tasa de crecimiento de las especies que componen la familia de las Microcystaceae (potenciales productoras de MYC) que se corresponde con los tratamientos de mayor tiempo de exposición al P (4P y 10P). Se encontró una relación significativa y positiva entre la concentración de MYC y el biovolumen máximo de las cianobacterias potencialmente productoras de esta toxina ($R^2 = 0.41$, $p < 0.001$) (**Fig. 13**).

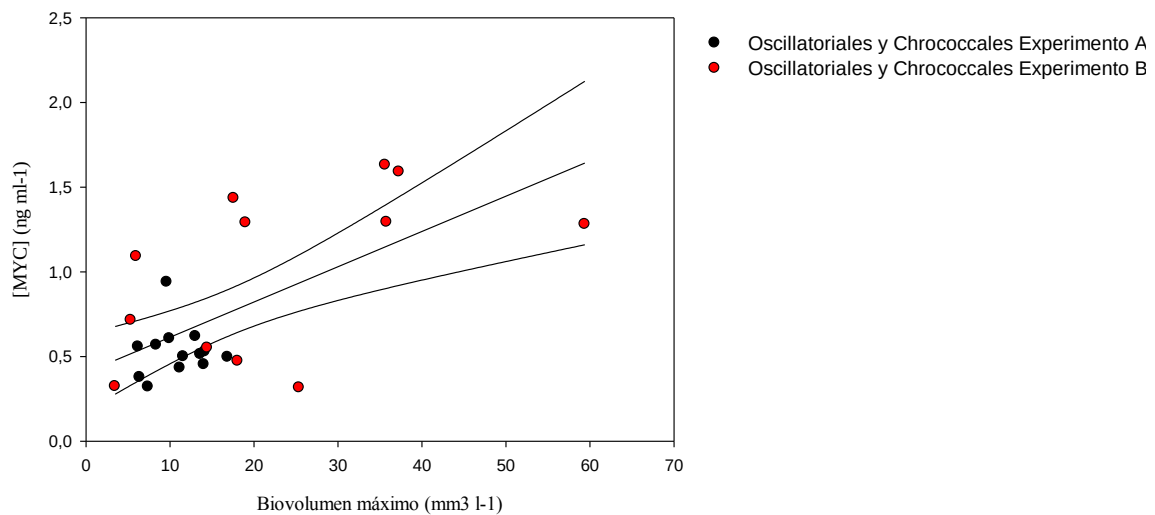


Figura 13. Regresión entre el biovolumen máximo de los órdenes potencialmente productores de microcistinas (Oscillatoriales y Chroococcales) y la concentración de microcistina. Se indica la función lineal ajustada y los intervalos de confianza (95%).

5. Discusión

Los resultados de esta tesis muestran que el tiempo de exposición al fosfato juega un papel clave para explicar la composición y crecimiento de cianobacterias tóxicas. Las cianobacterias en general, y las especies dominantes en el lago Javier, *C. raciborskii* y *P. agardhii*, exhibieron sus máximas tasas de crecimiento en los tratamientos con el mayor tiempo de exposición al fosfato testado. Hasta el presente estudio, no se había experimentado con la respuesta de poblaciones naturales de *C. raciborskii* a pulsos de alta frecuencia. Asimismo, mostramos que esta especie puede mantener su crecimiento bajo condiciones de estrés nutricional severo. Por lo tanto, la concentración de fósforo per se no explica los cambios observados en la comunidad ni la dominancia de determinadas especies de cianobacterias, sino la forma en que este nutriente es suministrado al medio, debido a que influye en la tasa de crecimiento de los organismos. A su vez, se determinó que el mayor tiempo de exposición al fosfato y la suficiencia por N y P se correlacionaron con la síntesis de saxitoxina y de microcistina, respectivamente, asociado a una mayor actividad metabólica inducida en los

organismos. Esto tiene implicancias significativas para la comprensión de la dinámica de las floraciones de cianobacterias y su toxicidad en condiciones fluctuantes y limitantes de nutrientes.

5.1. Cianobacterias planctónicas en períodos de estratificación

De acuerdo al biovolumen total y la estructura del fitoplancton el Lago Javier presentó características hipereutróficas, en acuerdo con los datos abióticos. El biovolumen del fitoplancton del lago estuvo dominado principalmente por especies de cianobacterias a lo largo de los tres momentos de estratificación de verano lo que concuerda con la primer predicción propuesta (predicción 1). La relación entre la zona eufótica y la zona de mezcla siempre fue menor a 1 ($0.1-0.25$) lo que implicó una baja disponibilidad lumínica para el crecimiento del fitoplancton. Las cianobacterias pueden tolerar y crecer con tasas mayores que algunos grupos eucariotas en condiciones de $Z_{eu}/Z_{mix} < 1$, como fue registrado anteriormente para el mismo lago (Fabre et al., 2010; Somma, 2014). Las especies de cianobacterias que son tolerantes a baja intensidad de luz se verán favorecidas en estas condiciones, como se demostró en un estudio realizado con más de 900 datos de campo, donde se determinó que *C. raciborskii* y *P. agardhii* contribuían en más de 80 % al biovolumen de fitoplancton, con $Z_{eu}/Z_{mix} < 1$ (0.68 y 0.75 para cada especie, respectivamente) (Bonilla et al., 2012). *C. raciborskii* y *P. agardhii* son especies tolerantes a la sombra y son las especies que aportaron mayor contribución al biovolumen total de la comunidad de fitoplancton en este trabajo. Varios estudios revelan que ambas especies tienen ventajas adaptativas para crecer frente a otras especies que componen el fitoplancton durante los períodos de estratificación (Harris & Baxter 1996; O'Brien et al., 2009; Bonilla et al., 2012; Burford & Davis, 2011).

La gran proporción de cianobacterias en el biovolumen total responde a la tolerancia a condiciones nutricionales limitantes (Isvánovics et al., 2000; Antenucci et al., 2005; Posselt et al., 2009; Burford et al., 2011; Carey et al., 2012, Amaral et al., 2014), como las registradas en nuestro estudio. En el muestreo de Eme y Eta, dónde la proporción de *C. raciborskii* al BV de fitoplancton fue máxima, las concentraciones de nutrientes disueltos fueron bajas o indetectables. Su dominancia en estas condiciones podría explicarse por la flexibilidad fenotípica y su capacidad de incorporar fosfato aún en

concentraciones muy bajas, como fuera demostrado experimentalmente (Prentice et al., 2015). En comparación con otras cianobacterias (*Aphanizomenon* y *Microcystis*), *C. raciborskii* presenta mayores tasas de incorporación de fosfato y de producción de fosfatasas alcalinas (Wu et al., 2009), lo que puede explicar su crecimiento en ambientes fuertemente limitados por P. *C. raciborskii* sería capaz de dominar el biovolumen del fitoplancton en condiciones de deficiencia de nutrientes por la alta afinidad de sus sistemas celulares de incorporación de fosfato, la gran capacidad de almacenamiento del mismo en forma de polifosfatos y de la síntesis de fosfatasas alcalinas (Isvánovics et al., 2000; Wu et al., 2009; Burford et al., 2011; Burford et al. 2016). Asimismo, *C. raciborskii* posee la capacidad de fijar N₂, como todas las Nostocales, lo que le otorga otra ventaja frente a otras especies para crecer en ecosistemas con baja concentración de nitrógeno inorgánico disuelto (NID) (Burford et al., 2011).

En este trabajo se encontró una alta proporción de *C. raciborskii* en el biovolumen del fitoplancton cuando la concentración de PT en el ambiente fue de 60 µg l⁻¹. Si bien el rango de PT encontrado en los tres muestreos no fue amplio, lo observado coincide con valores que reportan otros autores. Bonilla et al (2012) encontraron que esta especie alcanza sus mayores biomásas en lagos con PT promedio de 75 µg l⁻¹ y su vez concuerda con los rangos propuestos por Dolman et al. (2012). Amaral et al (2014) mostraron que cepas de *C. raciborskii* aisladas del lago Javier (MVCC19) y otra de EEUU (CCMP 1973), bajo condiciones de deficiencia por P, alcanzan su tasa máxima de crecimiento a concentraciones iguales o superiores a 80 µg l⁻¹ de fosfato. La variación en las respuestas va a depender de la fisiología del organismo, de las condiciones ambientales y de la forma en la que reciben los nutrientes (Glibert & Burkholder, 2011; O'Neil et al., 2012). Las cianobacterias presentan diferentes respuestas frente al enriquecimiento por N y P, por lo que se debería analizar la respuesta de las especies cuando se evalúa el efecto de los nutrientes en la estructura de la comunidad de fitoplancton (Dolman et al., 2012), ya que las cianobacterias son un grupo heterogéneo de organismos que tendrán respuestas diferentes al incremento de nutrientes en los ecosistemas acuáticos continentales.

5.2. Ventajas adaptativas de las cianobacterias frente a fluctuaciones de nutrientes

Efecto del Nitrógeno

En el experimento A no se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento de las cianobacterias (Nostocales, Oscillatoriales y Chroococcales) entre +N y -N, lo que indica que no estaban limitadas por este nutriente. Diversos estudios realizados con cultivos de especies fijadoras de N₂, principalmente con *C. raciborskii*, encontraron que la tasa de crecimiento fue mayor en condiciones de suficiencia por N que en deficiencia por dicho nutriente (Layzell et al., 1985; Saker & Neilan; 2001; Kenesi et al., 2009; De Tezanos Pinto & Litchman, 2010; Willis et al., 2016). Esto se adjudica a que el proceso de fijación de N₂ es más costoso desde el punto de vista energético, por lo que la tasa de crecimiento será mayor en presencia de fuentes de nitrógeno inorgánicas disueltas como amonio y nitrato (O'Neil et al., 2012). Las floraciones de *C. raciborskii* en ecosistemas limitados por N se explican por su capacidad de fijar N₂, si bien hay varios estudios que cuestionan si esta capacidad es realmente ventajosa (Moisander et al., 2011; Wood et al., 2014). *C. raciborskii* sería más eficiente que otras cianobacterias en la captación de NID, respondiendo como una especie generalista con gran flexibilidad metabólica frente a un amplio rango de concentraciones de N (Burford et al., 2006; Moisander et al., 2011). A su vez es posible que la concentración de fósforo añadida le haya otorgado la energía suficiente para el proceso de fijación de N₂ sin detrimento de disminuir su tasa de crecimiento. Se ha demostrado para *Dolichospermum flos-aquae* y *C. raciborskii* (Nostocales) que la fijación de N₂ es mayor en condiciones de suficiencia de fósforo en comparación a condiciones de deficiencia (Yema et al., 2016).

Los experimentos realizados en este trabajo se hicieron con el agua del lago sin filtrar por lo que dentro de las botellas también se encontraba el zooplancton. Estos organismos se alimentan del fitoplancton y liberan, a través de su excreción, nitrógeno orgánico que puede ser remineralizado por la comunidad bacteriana y quedar disponible en forma de amonio para su utilización por parte del fitoplancton (Sterner, 1989; Fasham et al., 1990; Berman & Chava, 1999). Al final de los experimentos la concentración de NID era mayor o igual a la concentración registrada al inicio del

mismo. Su origen puede explicarse por la depredación o por la senescencia de las poblaciones. Por lo tanto, se podría asociar el aumento del nitrógeno disuelto como resultado del reciclaje de nutrientes dentro de las botellas.

En el experimento B se detectaron diferencias significativas en el crecimiento de las especies, principalmente las pertenecientes a los órdenes Oscillatoriales y Chroococcales, posiblemente debido a las altas concentraciones de N aplicadas (528 μM de nitrato). Las Oscillatoriales y las Chroococcales son órdenes constituidas por géneros como *Planktothrix* y *Microcystis*, no fijadoras de N_2 , por lo que dependen de las fracciones disueltas de N para crecer. Estudios realizados con *Microcystis* y *Oscillatoria* demuestran que en condiciones de suficiencia por N la tasa de crecimiento es significativamente mayor en comparación con un estado deficiente por N (Sivonen, 1990; Davis et al., 2009).

Efecto del fósforo

En el experimento A la tasa de crecimiento global del fitoplancton fue significativamente mayor en los tratamientos con adición de P en comparación a los controles, lo que evidenció limitación por este nutriente. A su vez, el tiempo de exposición a este nutriente resultó en diferencias en el crecimiento. En los tratamientos +N la tasa de crecimiento global máxima correspondió al mayor tiempo de exposición al P (10 pulsos). Este resultado sugiere que los organismos fueron capaces de modificar sus tasas de incorporación de fosfato para crecer, como se ha demostrado experimentalmente en otros estudios (Aubriot et al., 2000; Aubriot et al., 2011; Aubriot & Bonilla, 2012). A nivel fisiológico, dichas modificaciones pueden ocurrir si el tiempo de reacción es menor a la duración de la disponibilidad del nutriente y se basa en la frecuencia y en la duración de los pulsos aplicados (Aubriot & Bonilla, 2012). Estudios realizados en nuestro laboratorio con aislamientos de *C. raciborskii* demostraron que la tasa de crecimiento aumenta cuando el fosfato es añadido en forma de pulsos consecutivos (Amaral et al., 2014). En el caso de *P. agardhii* y *R. mediterranea* su respuesta flexible al patrón de pulsos de fosfato fue determinada en varios estudios previos (Aubriot et al 2000; 2011; Aubriot & Bonilla, 2012). Otros estudios han demostrado que el crecimiento de *C. raciborskii* es promovido cuando se adiciona el fósforo de forma diaria en comparación a otras especies (frecuencia diaria) (Posselt et

al., 2009). En el experimento B de este trabajo, sin embargo, no se pudieron detectar diferencias en la tasa de crecimiento en relación a los pulsos de fósforo. En este experimento, si bien la comunidad de fitoplancton estaba inicialmente limitada por P, la adición de una concentración elevada de fósforo (33 μM) generó tiempos de exposición prolongados y similares entre los tratamientos con pulsos diferentes. Además puede haber existido co-limitación inicial por N y P, evidenciado por el crecimiento exponencial de la biomasa en el tratamiento +N+P, a diferencia de los tratamientos con adición de un solo nutriente.

En condiciones de deficiencia o estrés nutricional por P *C. raciborskii* resultó exitosa utilizando concentraciones del nutriente casi indetectables para su crecimiento (tratamientos control). Esto explica la dominancia de dicha especie durante la estratificación de verano y cuando la concentración de nutrientes disueltos en el epilimnion fue la más baja registrada en los tres muestreos realizados. La dominancia de *C. raciborskii* en estas condiciones posiblemente responda a la capacidad que tiene la especie de fijar N_2 , de tolerar condiciones nutricionales subóptimas respecto a la disponibilidad de fósforo y de beneficiarse de períodos de aportes del nutriente en forma de pulsos (Bonilla et al., 2012; Burford & Davis, 2009).

Las diferencias en la respuesta del crecimiento de nuestros experimentos permitieron explicar las estrategias ecofisiológicas de las especies frente a las fluctuaciones de nutrientes. En el experimento A, los organismos de los grupos dominantes Nostocales y Oscillatoriales, exhibieron tasas de crecimiento positivas frente a la adición de fósforo en la fase exponencial, y a su vez, en el tratamiento de 10 pulsos (mayor t_E) se observaron las mayores tasas de crecimiento. Otros estudios presentan evidencia similar indicando que tanto las Nostocales como las Oscillatoriales son favorecidas cuando el fósforo es añadido en forma de pulsos (De Nobel et al., 1997; Aubriot & Bonilla, 2012). Este patrón de fluctuación del nutriente podría producir un acople en la utilización del recurso limitante y la optimización del crecimiento, lo que se refleja en tasas de crecimiento similares entre grupos fisiológica y morfológicamente diferentes. Respuestas similares de organismos de los grupos Oscillatoriales y Nostocales frente a los pulsos de P podrían explicar períodos de coexistencia de especies. En los controles (0P), sin embargo, mientras que las Nostocales exhibieron crecimiento en fase exponencial, las Oscillatoriales mostraron tasas negativas (disminución de su biomasa),

indicando tolerancias diferentes al estrés por falta de fósforo. Un estudio reciente muestra esta misma tendencia comparando Nostocales y cianobacterias no heterocíticas en experimentos con y sin adición de nutrientes (Aguilera et al., 2017). Nuestros resultados remarcan la capacidad de las Nostocales de crecer utilizando concentraciones de fósforo muy bajas (indetectables por los métodos de medición convencionales) en comparación con las Oscillatoriales.

En la fase de crecimiento tardío, en los tratamientos de suficiencia por nutrientes (+N+P), las Nostocales decrecieron a una velocidad mayor que los otros grupos de cianobacterias. Por el contrario los organismos del orden Oscillatoriales mostraron un incremento en su biomasa en los controles (0P) durante la segunda etapa (tasa de crecimiento tardía positiva). Nuestros resultados evidencian dos estrategias diferentes sobre la utilización de los recursos disponibles para crecer. Las Nostocales presentaron un crecimiento rápido en fase exponencial y posteriormente disminuyeron su biovolumen a mayor velocidad que el resto de los grupos. Por otro lado las Oscillatoriales crecieron más lentamente y por lo tanto resultaron ser más persistentes a largo plazo. En el experimento B se pudo observar un escenario diferente. Las Nostocales exhibieron tasas de crecimiento positivas en la fase exponencial en los tratamientos -N, al igual que en los +N, posiblemente debido a la alta concentración de P que les permitiría activar el proceso de fijación de N₂. En los tratamientos -N+P se identificó un aumento de la concentración de NT al final del período de incubación, lo que puede ser un indicador indirecto de fijación de N₂ (Yema et al., 2016). A su vez, en los tratamientos -N y en los de mayor exposición al P (4P y 10P) se registraron tasas de crecimiento mayores en las Nostocales en comparación con los otros grupos de cianobacterias, lo que indica que un mayor tiempo de exposición al fósforo favoreció el uso eficiente del nutriente para optimizar su crecimiento.

En concordancia con lo observado para los grupos dominantes de cianobacterias, en la segunda etapa de los experimentos, las mayores diferencias se registraron en los tratamientos control. Mientras que el biovolumen de *C. raciborskii* disminuyó a una velocidad similar a los tratamientos de suficiencia, *P. agardhii* exhibió crecimiento tardío, es decir que fue capaz de aumentar su biomasa en esta segunda etapa a pesar de las bajas concentraciones de fósforo disuelto. Posiblemente debido a dichas condiciones de estrés nutricional, la incorporación de P ocurrió rápidamente, lo que explicaría el

crecimiento lento *a posteriori* de las poblaciones de *P. agardhii*. Cuando existe una limitación por P, los sistemas de incorporación se encuentran activos y las células se encuentran en estado de alta afinidad por este nutriente (Prentice et al., 2015), lo que permite que la incorporación del fósforo disuelto sea rápido (Istvánovics et al., 2000). Posteriormente a la incorporación, las cianobacterias pueden reservar el fósforo incorporado a través de la formación de gránulos de polifosfatos, donde el tamaño y la cantidad de éstos puede tener consecuencias en la tasa de crecimiento (Aubriot et al., 2011). Además, existen otros mecanismos para superar los estados de deficiencia por fósforo de los organismos como la liberación de fosfatasas alcalinas que hidrolizan el P orgánico en el medio acuático. Wu et al (2012) encontraron fosfatasas alcalinas en cultivos de *C. raciborskii* cuando la concentración de P fue menor a 50 µg l⁻¹. En nuestro trabajo, la concentración inicial de fósforo en los controles fue baja (60 y 70 µg l⁻¹, experimentos A y B, respectivamente), por lo que es posible que el crecimiento de *C. raciborskii* pudiera deberse a su capacidad de utilizar el fósforo orgánico presente a través de la síntesis de fosfatasas alcalinas. Es posible hipotetizar que poblaciones de cianobacterias en ambientes en proceso de mitigación de la eutrofización sean susceptibles al ingreso del nutriente por eventos meteorológicos intensos (Yang et al. 2016), lo que explicaría su persistencia en el ambiente.

Los organismos del orden Chroococcales crecieron en la segunda fase de ambos experimentos, indicando una fase *lag* mucho más larga que para los otros grupos de cianobacterias. Diversos estudios han demostrado que el incremento de biomasa de especies como *Microcystis aeruginosa* (también encontrada en nuestro estudio) está asociado a elevadas concentraciones tanto de N como de P en el agua (Rejmánková & Komárková, 2005; Harke et al., 2016). En nuestro trabajo las Chroococcales crecieron con altas concentraciones de ambos nutrientes (+N+P). Recientemente se ha demostrado que *Microcystis* es capaz de crecer frente a diferentes fuentes de fósforo (orgánico e inorgánico) con una fase *lag* de 5 días, para posteriormente crecer a una tasa mayor en comparación con algas eucariotas (Ren et al., 2016). Los resultados obtenidos en nuestros experimentos apoyan la hipótesis de que *Microcystis* requiere de altas concentraciones de nutrientes para poder crecer, lo que explicaría las floraciones persistentes de este organismo en ecosistemas acuáticos con eutrofización avanzada (Saxton et al., 2012, Dolman et al. 2012).

5.3. Síntesis de cianotoxinas

Saxitoxinas

Nuestros resultados indicaron que el tiempo de exposición al fósforo es una variable que influye en la concentración de saxitoxina que producen los organismos en comunidades naturales. Los resultados de ambos experimentos indican que el tratamiento con mayor tiempo de exposición al P (10P) presentó una concentración significativa mayor de saxitoxina por unidad de biomasa de cianobacterias lo que coincide con la predicción propuesta número 3. Estos resultados tienen implicancias en el posible papel, directo o indirecto, de la disponibilidad de nutrientes en la síntesis de cianotoxinas, aspecto que actualmente continua siendo foco de debate. En estudios realizados con *Anabaena flos-aquae* y *Nodularia spumigena* se ha encontrado que la concentración de nodularina (cianotoxina hepatotóxica) fue mayor en un rango de 200 a 5500 $\mu\text{g l}^{-1}$ de fósforo reactivo soluble en comparación con concentraciones menores a 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Lehtimäki et al., 1997; Pattanaik et al., 2010), rango que abarca a las concentraciones de fosfato utilizadas en ambos experimentos de nuestro estudio (A y B). Recientemente se ha observado en comunidades naturales que la [STX] por unidad de biomasa es mayor en condiciones de limitación por nutrientes (Aguilera et al., 2017). Sin embargo, una evidencia contradictoria con respecto al papel del fósforo se ha encontrado para la otra toxina que puede producir *C. raciborskii*, cylindrospermopsina (CYN). En experimentos realizados con comunidades naturales dominadas por *Cylindrospermopsis raciborskii*, la concentración de CYN, [CYN], aumentó con la adición de fosfato (Burford et al., 2014), mientras que otro estudio experimental concluye que la producción de cylindrospermopsina no cambia frente a la disponibilidad de fosfato (Willis et al., 2015). A través de los experimentos realizados en este trabajo pudimos determinar que el tiempo de exposición al fosfato tiene más relevancia que la concentración del nutriente en la concentración de saxitoxina. Podemos hipotetizar que la mayor síntesis de STX encontrada en el tratamiento 10P se debería a una mayor actividad metabólica de los organismos, manifestada en la mayor tasa de crecimiento resultante. Debido a que los resultados de diferentes trabajos continúan siendo contradictorios y que existen enormes diferencias en la síntesis y estructura química de cada tipo de toxina (i.e: CYN y STX), es necesario realizar más estudios a nivel

molecular que permitan dilucidar los mecanismos que expliquen el efecto tanto de la concentración de fosfato como el tiempo de exposición al mismo en la síntesis de STX.

Se encontraron resultados contradictorios sobre el efecto que podría tener el nitrógeno en la concentración final de saxitoxina por unidad de biomasa, ya que fue mayor en el tratamiento +N en el experimento A y en -N en el B. Según los antecedentes, en condiciones de deficiencia por nitrógeno la concentración de cianotoxinas aumenta en las Nostocales (Saker & Neilan, 2001; Shalev-Malul et al., 2008; Pattanaik et al., 2010). Por el contrario, hay estudios más recientes que plantean que la suficiencia por nitrógeno produce un aumento en la concentración de cianotoxinas (Willis et al., 2015; Brentano et al., 2016). Brentano et al (2016) mostraron que un aumento de N inorgánico disuelto y de la conductividad del agua en un ambiente natural se asoció con altas concentraciones de STX. Sin embargo, en un trabajo recientemente en nuestro laboratorio con cultivos de *Cylindrospermopsis raciborskii*, pudimos determinar que la concentración de saxitoxinas no varía con la adición o no de nitrato (Vico et al., 2016), apoyando la hipótesis de que las toxinas serían metabolitos secundarios y que su biosíntesis estaría relacionada al crecimiento y no a condiciones ambientales específicas (Stucken et al., 2014). En este sentido, nuestros resultados permiten apoyar la misma hipótesis ya que existió una tendencia positiva entre la [SXT] y la biomasa de *C. raciborskii*, y la máxima [STX] por unidad de biomasa fue detectada en condiciones nutricionales óptimas para el crecimiento de las cianobacterias dominantes. Debido a que los resultados de diferentes trabajos continúan siendo contradictorios y que existen enormes diferencias en la síntesis y estructura química de cada tipo de toxina, es necesario realizar más estudios a nivel molecular que permitan dilucidar los mecanismos que expliquen el efecto tanto de la concentración de fosfato como el tiempo de exposición al mismo en la síntesis de STX.

Microcistinas

En esta tesis se pudo determinar que el tiempo de exposición al fósforo y la alta disponibilidad de nitrógeno son dos variables que influyen significativamente en la concentración de microcistinas producidas por los organismos en comunidades naturales. Diversos experimentos establecieron relaciones positivas entre la adición de

nitrógeno inorgánico disuelto y la producción y concentración de MYC (Sivonen, 1990; Orr & Jones, 1998; Long et al., 2001). A su vez, estudios en el campo encuentran que floraciones del género *Microcystis* (potencial productora de microcistina) están asociadas a altas concentraciones de N (Gobler et al., 2007; Davis et al., 2010). La relación que existe entre la disponibilidad de nitrógeno y la síntesis de MYC resulta clave dado que la microcistina requiere de grandes cantidades de aminoácidos ricos en nitrógeno, por lo que su síntesis depende indirectamente de la disponibilidad de este nutriente (Gobler et al., 2016).

Algunos estudios proponen que la concentración alta de fósforo podría promover la síntesis de MYC (Utkilen & Gjølme, 1995). De forma consistente con esta hipótesis, algunos trabajos reportan un mayor incremento de cepas tóxicas de *Microcystis* sp. con altas concentraciones de ortofosfato en relación con las cepas que no producen MYC (Davis et al., 2010). En el experimento B de nuestro estudio, con adición de una concentración alta de P, la tasa de cambio de microcistina por unidad de biomasa con respecto al inicio fue de dos o tres órdenes de magnitud mayor que en el experimento A. Esto se debería al crecimiento de las poblaciones de la familia Microcystaceae productoras de microcistina. Esta familia fue la única que creció en la segunda etapa del experimento B (fase de crecimiento tardío), apoyando la hipótesis de la disponibilidad de fósforo. Sin embargo, otros autores han encontrado un incremento en la síntesis de microcistina cuando aumenta la densidad celular en cultivos de *Microcystis aeruginosa* (Kaebernik & Neilan, 2001; Orr and Jones, 1998), indicando que la producción de toxinas responde a la comunicación celular (tipo *quorum sensing*) en las poblaciones y que es denso dependiente. En los experimentos realizados en este trabajo se pudo detectar que la mayor tasa de cambio de microcistinas por unidad de biomasa estaba asociada a la mayor tasa de crecimiento de las especies que componen la familia Microcystaceae (potenciales productoras de MYC). Por lo tanto, las variaciones en la disponibilidad de nutrientes tienen un efecto directo en la tasa de crecimiento, lo cual afecta indirectamente a la concentración de toxina (Kaebernik & Neilan, 2001; Orr and Jones, 1998).

6. Conclusiones

1. Las fluctuaciones de fosfato promueven el crecimiento de cianobacterias florecedoras y la codominancia de especies. El tiempo de exposición a este nutriente es un factor crítico que determina la tasa de crecimiento de las especies de cianobacterias.
2. *C. raciborskii* es una especie tolerante a concentraciones bajas e indetectables de fosfato lo que le otorga una ventaja adaptativa para poder crecer frente a otras especies del fitoplancton. Pudimos demostrar que es una especie capaz de optimizar su crecimiento frente a fluctuaciones del nutriente en cortos períodos de tiempo en un escenario complejo como son las comunidades naturales de fitoplancton.
3. Se determinaron estrategias antagonistas en el uso de los nutrientes entre las Nostocales y las Oscillatoriales. Las Nostocales son capaces de explotar condiciones favorables e incrementar su biomasa en un período más corto (pocos días), mientras que las Oscillatoriales crecen de forma más lenta y sostenida en ambientes enriquecidos por nutrientes.
4. La concentración de toxinas, tanto de saxitoxinas como de microcistinas, resultó mayor en condiciones fluctuantes de fósforo. Para el caso de las microcistinas, la concentración de las mismas también estuvo afectada por la disponibilidad de N. La disponibilidad de nutrientes afecta el metabolismo y a la capacidad de crecer de las cianobacterias. Por lo tanto, en condiciones nutricionales óptimas para el crecimiento de cianobacterias se espera que aumente la concentración de toxinas.
5. La respuesta de las cianobacterias al enriquecimiento por nutrientes debe ser evaluada de forma específica debido a que son un grupo fisiológicamente heterogéneo ya que responde de forma específica a determinadas condiciones ambientales. Esta información es importante para el diseño de modelos de respuesta de las cianobacterias a la eutrofización.

7. Perspectivas

Los resultados que se arrojaron en esta tesis son novedosos para el área de conocimiento. Actualmente el estudio de los factores y las condiciones que estimulan el crecimiento de cianobacterias es foco de debate en la comunidad científica. Sin embargo es necesario continuar realizando estudios que contemplen diversas aproximaciones metodológicas. Sería crucial poder realizar experimentos con mesocosmos para acercarnos de forma más realista a lo que ocurre en los ecosistemas. A su vez, sería importante realizar estudios moleculares que permitan dilucidar en qué momento de la curva de crecimiento de las cianobacterias se desencadena la expresión de toxinas y si esa máxima expresión se relaciona directa y positivamente con la máxima tasa de crecimiento.

Bibliografía

- Aguilera, A., Aubriot, L., Echenique, R. O., Salerno, G. L., Brena, B. M., Pérez, M., & Bonilla, S. (2017). Synergistic effects of nutrients and light favour Nostocales over non-heterocystous cyanobacteria. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3099-1>
- Amaral, V. (2011). *Flexibilidad fenotípica de la cianobacteria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* a fluctuaciones en la disponibilidad de fosfato*. Universidad de la República, Facultad de Ciencias.
- 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. <http://doi.org/10.1080/09670262.2014.897760>
- Anderson, D. M., Glibert, P. M., & Burkholder, J. M. (2002). Harmful Algal Blooms and Eutrophication Nutrient Sources, Composition, and Consequences. *Estuaries*, 25(4b), 704–726.
- Antenucci, J. P., Ghadouani, A., Burford, M. a., & Romero, J. R. (2005). The long-term effect of artificial destratification on phytoplankton species composition in a subtropical reservoir. *Freshwater Biology*, 50(6), 1081–1093. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01374.x>
- Antunes, J. T., Leão, P. N., & Vasconcelos, V. M. (2012). Influence of Biotic and Abiotic Factors on the Allelopathic Activity of the Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* Strain LEGE 99043. *Microbial Ecology*, 64, 584–592. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0061-7>
- Apeldoorn, M., Van Egmond, H., Speijers, G., & Bakker, G. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Mol Nutr Food Res*, 57, 7–60.

- APHA. (1985). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington: APHA/AWWA/WPCF.
- Arrigo, K. (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, 437, 349–355. <http://doi.org/10.1038/nature04158>
- Aubriot, L., Wagner, F., & Falkner, G. (2000). The phosphate uptake behaviour of phytoplankton communities in eutrophic lakes reflects alterations in the phosphate supply. *Eur. J. Phycol*, 35, 255–262.
- Aubriot, L. (2008). *Flexibilidad de la cinética de incorporación de fosfato por fitoplancton a las fluctuaciones en el suministro del nutriente*. Universidad de la República, Facultad de Ciencias.
- Aubriot, L., Bonilla, S., & Falkner, G. (2011). Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton in response to environmental phosphate fluctuations. *FEMS microbiology ecology*, 77, 1–16.
- Aubriot, L., & Bonilla, S. (2012). Rapid regulation of phosphate uptake in freshwater cyanobacterial blooms. *Aquatic Microbial Ecology*, 67, 251–263.
- Bar-Yosef, Y., Sukenik, A., Hadas, O., Viner-mozzini, Y., Kaplan, A., & Box, P. O. (2010). Report Enslavement in the Water Body by Toxic *Aphanizomenon ovalisporum*, Inducing Alkaline Phosphatase in Phytoplanktons. *Current Biology*, 20(17), 1557–1561. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.07.032>
- Beamud, G., Vico, P., Haakonsson, S., Martínez de la Escalera, G., Piccini, C., Brena, B. M., Pérez, M. & Bonilla, S. (2015). Influence of UV-B radiation on the fitness and toxin expression of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia*, 763(1), 161–172. <http://doi.org/10.1007/s10750-015-2370-6>
- Berman, T., & Chava, S. (1999). Algal growth on organic compounds as nitrogen sources. *Journal of Plankton Research*, 21(8), 1423–1437. <https://doi.org/10.1093/plankt/21.8.1423>
- Bonilla, S. (2009). *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. (S. Bonilla, Ed.) (p. 105). Montevideo, Uruguay: UNESCO Programa Hidrológico Internacional.
- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M. C. S., González-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V. L. M., Lüring, M., et al. (2012). What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS microbiology ecology*, 79(3), 1–14.
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., ... Aubriot, L. (2015). Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay Cyanobacteria and cyanotoxins in freshwaters of Uruguay. *Innotec*, 10, 9–22.
- Brentano, D. M., Giehl, E. L. H., & Petrucio, M. M. (2016). Abiotic variables affect STX concentration in a meso-oligotrophic subtropical coastal lake dominated by *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae). *Harmful Algae*, 56, 22–28. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2016.03.017>
- Burford, M. a., Mcneale, K. L., & McKenzie-Smith, F. J. (2006). The role of nitrogen in promoting the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. *Freshwater Biology*, 51, 2143–2153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01630.x>

- Burford, M. a., & Davis, T. W. (2011). Physical and chemical processes promoting dominance of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(4), 883–891. <http://doi.org/10.1007/s00343-011-0517-5>
- Burford, M. A., Davis, T. W., Orr, P. T., Sinha, R., Willis, A., & Neilan, B. A. (2014). Nutrient-related changes in the toxicity of field blooms of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(1), 135–148. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12341>
- Burford, M. a., Beardall, J., Willis, A., Orr, P. T., Magalhaes, V. F., Rangel, L. M., ... Neilan, B. a. (2016). Understanding the winning strategies used by the bloom-forming cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*, 54, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.012>
- Carey, C. C., Ibelings, B. W., Hoffmann, E. P., Hamilton, D. P., & Brookes, J. D. (2012). Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research*, 46, 1394–1407. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.016>
- Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins. *The Journal of Applied Bacteriology*, 72, 445–459.
- Carneiro, R. L., dos Santos, M. E. V., Pacheco, a. B. F., & Azevedo, S. M. F. D. O. E. (2009). Effects of light intensity and light quality on growth and circadian rhythm of saxitoxins production in *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Journal of Plankton Research*, 31(5), 481–488. <http://doi.org/10.1093/plankt/fbp006>
- Castro, D., Vera, D., Lagos, N., García, C., & Vásquez, M. (2004). The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10. *Toxicon*, 44, 483–489. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.06.005>
- Cavaliere, R. (2008). *THE REGULATION OF SAXITOXIN PRODUCTION IN CYANOBACTERIA*. University of New South Wales, Sydney.
- Chorus, I., & Bartram, J. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. (I. Chorus & J. Bartram, Eds.). St Edmundsbury Press.
- Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Havens, K. E., ... Likens, G. E. (2009). Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*, 323, 1014–1015. <https://doi.org/10.1126/science.1167755>
- Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L., & Gobler, C. J. (2009). The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, 8(5), 715–725. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.02.004>
- Davis, T. W., Harke, M. J., Marcoval, M. A., Goleski, J., Orano-Dawson, C., Berry, D. L., & Gobler, C. J. (2010). Effects of nitrogenous compounds and phosphorus on the growth of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacterial blooms. *Aquatic Microbial Ecology*, 61(2), 149–162. <https://doi.org/10.3354/ame01445>
- De Nobel, W. T., Huisman, J., Snoep, J. L., & Mur, L. R. (1997). Competition for phosphorus between the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena* and

- Aphanizomenon. *FEMS Microbiology Ecology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(97\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(97)00067-6)
- De Tezanos Pinto, P., & Litchman, E. (2010). Interactive effects of N:P ratios and light on nitrogen-fixer abundance. *Oikos*, 119, 567–575. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17924.x>
- Dignum, M., H. C. P. Matthijs, et al. (2005). Nutrient limitation of freshwater Cyanobacteria. *Harmful Cyanobacteria*. J. Huisman, H. Matthijs and P. Visser. Dordrecht, Springer: 65–86.
- Dokulil, M. T., & Teubner, K. (2000). Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438, 1–12.
- Dolman, A. M., Rücker, J., Pick, F. R., Fastner, J., Rohrlack, T., Mischke, U., & Wiedner, C. (2012). Cyanobacteria and cyanotoxins: the influence of nitrogen versus phosphorus. *PloS One*, 7(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038757>
- Esteves, F. de A. (2011). *Fundamentos de Limnología*. (I. Ltda., Ed.) (Tercera ed). Rio de Janeiro.
- Fabre, A. (2011). *Flexibilidad fisiológica de la cianobacteria invasora Cyndrospermopsis raciborskii en un gradiente lumínico*. Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo.
- Fabre, A., Carballo, C., Hernández, E., Piriz, P., Bergamino, L., Mello, L., González, S., et al. (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(1), 112–125.
- Falkner, R., & Falkner, G. (1989). Phosphate uptake by eukaryotic algae in cultures and by mixed phytoplankton population in a lake: Analysis by a force-flow relationship. *Botanica Acta*, 102, 283–286.
- Falkner, G., Wagner, F., Small, J., & Falkner, R. (1995). Influence of fluctuating phosphate supply on the regulation of phosphate uptake by the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Journal of Phycology*, 31, 745–753.
- Fasham, M. J. R., Ducklow, H. W., & McKelvie, S. M. (1990). A nitrogen-based model of plankton dynamics in the oceanic mixed layer. *Journal of Marine Research*, 48(November), 591–639. <https://doi.org/10.1357/002224090784984678>
- Flores, E., & Herrero, A. (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 164–167. <http://doi.org/10.1042/BST0330164>
- Frontier, S. (1976). Étude de la décroissance des valeurs propres dans une analyse en composantes principales: Comparaison avec le modèle du baton brisé. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 25(1), 67–75. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(76\)90076-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(76)90076-9)
- Glibert, P. M., & Burkholder, J. M. (2011). Harmful algal blooms and eutrophication: “strategies” for nutrient uptake and growth outside the Redfield comfort zone. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 29(4), 724–738.
- Gobler, C. J., Davis, T. W., Coyne, K. J., & Boyer, G. L. (2007). Interactive influences of nutrient loading, zooplankton grazing, and microcystin synthetase gene expression on cyanobacterial bloom dynamics in a eutrophic New York lake. *Harmful Algae*, 6(1), 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.08.003>

- Gobler, C. J., Burkholder, J. M., Davis, T. W., Harke, M. J., Johengen, T., Stow, C. a., & Van de Waal, D. B. (2016). The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.010>
- Harris, G., & Baxter, G. (1996). Interannual variability in phytoplankton biomass and species composition in a subtropical reservoir. *Freshwater Biology*, 35, 545–560.
- Harke, M. J., Steffen, M. M., Gobler, C. J., Otten, T. G., Wilhelm, S. W., Wood, S. A., & Paerl, H. W. (2016). A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae*, 54, 4–20. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.007>
- Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M., Anderson, D. M., Cochlan, W., Dennison, W. C., Dortch, Q., et al. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*, 8(1), 3–13.
- Hennemann, M. C., & Petrucio, M. M. (2016). High chlorophyll a concentration in a low nutrient context: discussions in a subtropical lake dominated by Cyanobacteria. *Journal of Limnology*, 75(3). <http://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1347>
- Hillebrand, H., Durselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35, 403–424.
- Hudson, J. J., Taylor, W. D., & Schindler, D. W. (2000). Phosphate concentrations in lakes. *Nature*, 406(6791), 54–6. <https://doi.org/10.1038/35017531>
- Isvánovics, 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.
- Jang, M.-H., Ha, K., Joo, G.-J., & Takamura, N. (2003). Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. *Freshwater Biology*, 48, 1540–1550.
- Jang, M. H., Jung, J. M., & Takamura, N. (2007). Changes in microcystin production in cyanobacteria exposed to zooplankton at different population densities and infochemical concentrations. *Limnology and Oceanography*, 52(4), 1454–1466. <https://doi.org/10.4319/lo.2007.52.4.1454>
- Jöhnk, K. D., Huisman, J., Sharples, J., Sommeijer, B., Visser, P. M., & Stroom, J. M. (2008). Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change Biology*, 14(3), 495–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01510.x>
- Kaebernick, M., & Neilan, B. a. (2001). Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology Ecology*, 35, 1–9.
- Kalff, J. (2001). *Limnology: Inland Water Ecosystems*. Prentice Hall.
- Kenesi, G., Shafik, H. M., Kovács, A. W., Herodek, S., & Présing, M. (2009). Effect of nitrogen forms on growth, cell composition and N₂ fixation of *Cylindrospermopsis raciborskii* in phosphorus-limited chemostat cultures. *Hydrobiologia*, 623, 191–202. <http://doi.org/10.1007/s10750-008-9657-9>
- Kirk, J. T. (1994). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(95\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0304-3770(95)90010-1)
- Komárek, J., Kling, H., & Komárková, J. (2003). Filamentous cyanobacteria. *Freshwater Algae of North America*, 4, 117–196

- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., & Johansen, J. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*, 86, 295–335.
- Kulaev, I. S., & Vagabov, V. M. (1983). Polyphosphate Metabolism in Micro-Organisms. *Advances in Microbial Physiology*, 24, 83–171. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60385-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60385-9)
- Lampert, W., & Sommers, U. (2007). *Limnoecology*. New York: Oxford University Press.
- Layzell, D. B., Turpin, D. H., & Elrifi, I. R. (1985). Effect of N Source on the Steady State Growth and N Assimilation of P-limited *Anabaena flos-aquae*. *Plant Physiology*, 78(4), 739–745. <http://doi.org/10.1104/pp.78.4.739>
- Legendre, P., & Legendre, L. (2002). *Numerical Ecology*. Elsevier.
- Lehtimäki, J., Moisander, P., Sivonen, K., Kononen, K., Moisander, P. I. A., & Sivonen, K. (1997). production by two baltic sea cyanobacteria . Growth, Nitrogen Fixation, and Nodularin Production by Two Baltic Sea Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 1647–1656.
- Lepš, J., & Smilauer, P. (2003). *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*. Cambridge University Press.
- Long, B., Jones, G. J., & Orr, P. T. (2001). Cellular Microcystin Content in N-Limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Microbiology*, 67(1), 278–283. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.278>
- Lüring, M., Eshetu, F., Faassen, E. J., Kosten, S., & Huszar, V. L. M. (2012). Comparison of cyanobacterial and green algal growth rates at different temperatures. *Freshwater Biology*. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02866.x>
- Martigani, F. (2012). *Influencia de la deficiencia por nutrientes en el crecimiento y la producción de toxinas de una cianobacteria invasora*. Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Montevideo.
- Moisander, P. H., Cheshire, L. A., Braddy, J., Calandrino, E. S., Hoffman, M., Piehler, M. F., & Paerl, H. W. (2012). Facultative diazotrophy increases *Cylindrospermopsis raciborskii* competitiveness under fluctuating nitrogen availability. *FEMS Microbiology Ecology*, 800–811. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01264.x>
- Murray, S. a, Mihali, T. K., & Neilan, B. a. (2011). Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. *Molecular Biology and Evolution*, 28(3), 1173–1182. <http://doi.org/10.1093/molbev/msq295>
- Neilan, B. a, Pearson, L. a, Muenchhoff, J., Moffitt, M. C., & Dittmann, E. (2012). Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 1–15. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02729.x>
- Nusch, E. (1980). Comparisons of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv Für Hydrobiologie Ergebnisse Der Limnologie*, 14, 14–36.
- O'Brien, K. R., Burford, M. a., & Brookes, J. D. (2009). Effects of light history on primary productivity in a phytoplankton community dominated by the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Freshwater Biology*, 54(2), 272–282. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02106.x>

- O'Neil, J. M., Davis, T. W., Burford, M. A., & Gobler, C. J. (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*, 14, 313–334. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027>
- Orchard, E. D., Webb, E. a., & Dyhrman, S. T. (2009). Molecular analysis of the phosphorus starvation response in *Trichodesmium* spp. *Environmental Microbiology*, 11(9), 2400–2411. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01968.x>
- Orr, P. T., & Jones, G. J. (1998). Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography*, 43(7), 1604–1614. <http://doi.org/10.4319/lo.1998.43.7.1604>
- Paerl, H. W. (1997). Coastal eutrophication and harmful algal blooms: Importance of atmospheric deposition and groundwater as “new” nitrogen and other nutrient sources. *Limnetica*, 42(5), 1154–1165.
- Paerl, H. W., & Huisman, J. (2009). Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1(1), 27–37. <http://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x>
- Paerl, H. W., Gardner, W. S., Havens, K. E., Joyner, A. R., McCarthy, M. J., Newell, S. E., ... Scott, J. T. (2016). Mitigating cyanobacterial harmful algal blooms in aquatic ecosystems impacted by climate change and anthropogenic nutrients. *Harmful Algae*, 54, 213–222. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.009>
- Pattanaik, B., Wulff, A., Roleda, M. Y., Garde, K., & Mohlin, M. (2010). Production of the cyanotoxin nodularin—A multifactorial approach. *Harmful Algae*, 10, 30–38. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2010.06.001>
- Posselt, A. J., Burford, M. a., & Shaw, G. (2009). Pulses of Phosphate Promote Dominance of the Toxic Cyanophyte *Cylindrospermopsis Raciborskii* in a Subtropical Water Reservoir. *Journal of Phycology*, 45, 540–546.
- Prentice, M. J., O'Brien, K. R., Hamilton, D. P., & Burford, M. A. (2015). High- and low-affinity phosphate uptake and its effect on phytoplankton dominance in a phosphate-depauperate lake. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 139–153. <https://doi.org/10.3354/ame01751>
- Redfield, A. C. (1958). The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, 138, 43–64.
- Rejmánková, E., & Komárková, J. (2005). Response of cyanobacterial mats to nutrient and salinity changes. *Aquatic Botany*, 83, 87–107. <https://doi.org/10.1023/A>
- Ren, L., Wang, P., Wang, C., Chen, J., Hou, J., & Qian, J. (2016). Algal growth and utilization of phosphorus studied by combined mono-culture and co-culture experiments. *Environmental Pollution*, 220, 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.061>
- 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(1–3), 9–21. <http://doi.org/10.1007/BF00007405>
- Reynolds, C. S. (2006). *Ecology of Phytoplankton*. (M. Usher, D. Saunders, R. Peet, & A. Dobson, Eds.). Cambridge University Press.

- Rigler, F. H. (1956). A Tracer Study of the Phosphorus Cycle in Lake Water. *Ecology*, 37(3), 550–562. CR–Copyright © 1956 Ecological Soc. <http://doi.org/10.2307/1930179>
- Rodríguez-Gallego, L. (2010). *Eutrofización de las lagunas costeras de Uruguay : impacto y optimización de los usos del suelo*. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Saker, M. L., & Neilan, B. A. (2001). Varied Diazotrophies, Morphologies, and Toxicities of Genetically Similar Isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from Northern Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1839–1845. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1839>
- Saxton, M. a, Arnold, R. J., Bourbonniere, R. a, McKay, R. M. L., & Wilhelm, S. W. (2012). Plasticity of Total and Intracellular Phosphorus Quotas in *Microcystis aeruginosa* Cultures and Lake Erie Algal Assemblages. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00003>
- Schindler, D. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science (New York, N.Y.)*, 195(4275), 260–262. <https://doi.org/10.1126/science.195.4275.260>
- Schindler, D. W., Hecky, R. E., Findlay, D. L., Stainton, M. P., Parker, B. R., Paterson, M. J., ... Kasian, S. E. M. (2008). Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), 11254–11258. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805108105>
- Shalev-Malul, G., Lieman-Hurwitz, J., Viner-Mozzini, Y., Sukenik, A., Gaathon, A., Lebendiker, M., & Kaplan, A. (2008). An AbrB-like protein might be involved in the regulation of cylindrospermopsin production by *Aphanizomenon ovalisporum*. *Environmental Microbiology*, 10(4), 988–999. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01519.x>
- Sivonen, K. (1990). Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2658–2666.
- Smith, V. H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. *Environmental Science and Pollution Research*, 10(2), 126–139.
- Somma, A. (2014). *El papel de la luz y la temperatura en la dinámica de cianobacterias en un lago de uso recreativo*. Universidad de la República.
- Sournia, A. (1978). *Phytoplankton Manual. Phytoplankton maual* (Vol. Monographs). United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. <http://doi.org/10.2216/i0031-8884-19-4-341.1>
- Sprober, P., Shafik, H. M., Présing, M., Kovács, A. W., & Herodek, S. (2003). Nitrogen uptake and fixation in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* under different nitrogen conditions. *Hydrobiologia*, 506–509, 169–174. <http://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000008617.90245.5f>
- Sterner, R. (1989). Resource competition during seasonal succession toward dominance by cyanobacteria. *Ecology*, 70(1), 229–245.
- Stomp, M., van Dijk, M. a, van Overzee, H. M. J., Wortel, M. T., Sigon, C. a M., Egas, M., ... Huisman, J. (2008). The timescale of phenotypic plasticity and its impact on

- competition in fluctuating environments. *The American Naturalist*, 172(5), 169–85. <https://doi.org/10.1086/591680>
- Stucken, K., John, U., Cembella, A., Soto-Liebe, K., & Vásquez, M. (2014). Impact of nitrogen sources on gene expression and toxin production in the diazotroph *Cylindrospermopsis raciborskii* CS-505 and non-diazotroph *Raphidiopsis brookii* D9. *Toxins*, 6(6), 1896–1915. <http://doi.org/10.3390/toxins6061896>
- Toporowska, M., Pawlik-Skowrońska, B., & Kalinowska, R. (2016). Mass Development of Diazotrophic Cyanobacteria (Nostocales) and Production of Neurotoxic Anatoxin-a in a Planktothrix (Oscillatoriales) Dominated Temperate Lake. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(9). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3004-y>
- Utkilen, H., & Gjølme, N. (1995). Iron-Stimulated Toxin Production in *Microcystis aeruginosa* Edited by Foxit Reader. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 797–800.
- Valderrama, J. C. (1981). The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10, 109–122.
- Vico, P., Aubriot, L., Martigani, F., Rigamonti, N., Bonilla, S., & Piccini, C. (2016). Influence of nitrogen availability on the expression of genes involved in the biosynthesis of saxitoxin and analogs in *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*, 56, 37–43. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2016.04.008>
- 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(2), 142–151.
- Watson, S. B., Mccauley, E., & Downing, J. a. (1997). Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnology and Oceanography*, 42(3), 487–495. <http://doi.org/10.4319/lo.1997.42.3.0487>
- Whitton, B., & Potts, M. (2000). *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Wiedner, C., Rücker, J., Brüggemann, R., & Nixdorf, B. (2007). Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia*, 152, 473–84. <http://doi.org/10.1007/s00442-007-0683-5>
- Willis, A., Adams, M. P., Chuang, A. W., Orr, P. T., O'Brien, K. R., & Burford, M. a. (2015). Constitutive toxin production under various nitrogen and phosphorus regimes of three ecotypes of *Cylindrospermopsis raciborskii* ((Wołoszyńska) Seenayya et Subba Raju). *Harmful Algae*, 47, 27–34. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2015.05.011>
- Willis, A., Chuang, A. W., Woodhouse, J. N., Neilan, B. a, & Burford, M. a. (2016). Intraspecific variation in growth, morphology and toxin quotas for the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 119, 307–310. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.07.005>
- Wood, S. A., Pochon, X., Luttringer-Plu, L., Vant, B. N., & Hamilton, D. P. (2014). Recent invader or indicator of environmental change? A phylogenetic and ecological study of *Cylindrospermopsis raciborskii* in New Zealand. *Harmful Algae*, 39, 64–74. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.013>

- Wu, Z., Shi, J., & Li, R. (2009). Comparative studies on photosynthesis and phosphate metabolism of *Cylindrospermopsis raciborskii* with *Microcystis aeruginosa* and *Aphanizomenon flos-aquae*. *Harmful Algae*, 8(6), 910–915. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.05.002>
- Wu, Z., Zeng, B., Li, R., & Song, L. (2012). Physiological regulation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) in response to inorganic phosphorus limitation. *Harmful Algae*, 15, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.11.005>
- Yang, Z., Zhang, M., Shi, X., Kong, F., Ma, R., & Yu, Y. (2016). Nutrient reduction magnifies the impact of extreme weather on cyanobacterial bloom formation in large shallow Lake Taihu (China). *Water Research*, 103, 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.047>
- Yema, L., Litchman, E., & de Tezanos Pinto, P. (2016). The role of heterocytes in the physiology and ecology of bloom-forming harmful cyanobacteria. *Harmful Algae*, 60, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.007>
- Zimmer, R. K., & Ferrer, R. P. (2007). Neuroecology, Chemical Defense, and the Keystone Species Concept. *Biol. Bull.*, 213, 208–225.