



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

Tesina

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Profundización en Ecología

Control de las floraciones de cianobacterias tóxicas: Influencia del uso de cloruro férrico en el crecimiento y la morfología de *Raphidiopsis (Cylindrospermopsis) raciborskii*

Bachiller Florencia Clivio

Orientador: Dr. Luis Aubriot

Co-orientadora: Mag. Andrea Somma

Sección Limnología – Facultad de Ciencias – Universidad de la República

| | |
|--|-----------|
| Índice | |
| Resumen | 3 |
| Introducción | 4 |
| Objetivo | 8 |
| Objetivo general | 8 |
| Objetivos específicos | 8 |
| Materiales y Métodos | 8 |
| Condiciones de cultivo | 8 |
| Condiciones de aclimatación a la deficiencia por Fe | 9 |
| Diseño Experimental | 9 |
| Determinación del crecimiento | 10 |
| Determinación de la morfología y biovolumen | 10 |
| Determinación de nutrientes | 11 |
| Análisis de datos | 12 |
| Resultados | 13 |
| Floculación de <i>R. raciborskii</i> bajo condiciones óptimas de nutrientes y fijación de N ₂ | 13 |
| Efecto del FeCl ₃ en el crecimiento de <i>R. raciborskii</i> en condiciones óptimas de nutrientes | 14 |
| Efecto del FeCl ₃ en el crecimiento de <i>R. raciborskii</i> bajo fijación de N ₂ | 17 |
| Respuesta morfológica de <i>R. raciborskii</i> en condiciones óptimas de nutrientes y fijación de N ₂ | 22 |
| Discusión | 26 |
| Influencia del Fe en el crecimiento con disponibilidad óptima de nutrientes | 27 |
| Influencia del Fe en el crecimiento bajo fijación de N atmosférico | 29 |
| Flexibilidad morfológica | 30 |
| Conclusiones | 33 |
| Agradecimientos | 35 |
| Anexo A | 36 |
| Bibliografía | 38 |

Resumen

Las floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas son un fenómeno cada vez más frecuente en los ecosistemas acuáticos debido al aporte excesivo de nutrientes de origen antrópico, lo que trae consecuencias negativas sobre los usos de los cuerpos de agua dulce y la biodiversidad. El aporte de fósforo (P) y nitrógeno (N) a los sistemas de agua dulce ha aumentado en las últimas décadas como consecuencia de la creciente producción industrial, agrícola-ganadera y la urbanización. De manera general, una forma de amortiguar éste fenómeno es controlar los aportes de P desde la cuenca y los sedimentos (carga interna) a través de la coprecipitación con metales en condiciones aeróbicas. En particular, el cloruro férrico (FeCl_3) es ampliamente utilizado en el tratamiento de efluentes. Sin embargo, su capacidad de controlar el crecimiento de cianobacterias por floculación y precipitación del P disponible es menos conocida. Los efectos en el ambiente pueden ser muy complejos de predecir, en particular en presencia de cianobacterias capaces de soportar bajas concentraciones de P, y de fijar N atmosférico, por la necesidad de Fe para el funcionamiento de la enzima nitrogenasa. La cianobacteria filamentosa y formadora de floraciones *Raphidiopsis raciborskii* (orden Nostocales) posee ambas características destacándose también por su alta toxicidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de hierro (FeCl_3) en el crecimiento y morfología de una cepa nativa de *R. raciborskii* (MVCC19) en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno atmosférico (-N y +N), y deficiencia por Fe. Se realizaron dos experimentos en los que se adicionaron diferentes concentraciones de FeCl_3 más un control sin adición. Se determinaron las tasas de crecimiento, el contenido de fósforo y nitrógeno particulado (PP y NP) y la concentración de fósforo reactivo soluble (PRS). Se cuantificó la abundancia y biomasa y se midieron los filamentos y las células especializadas presentes. Independientemente de la disponibilidad de N, la tasa máxima de crecimiento se registró en los tratamientos donde se adicionó una concentración de Fe óptima en fijación de N atmosférico, mientras que con disponibilidad de N disuelto, el crecimiento se sostuvo hasta concentraciones de Fe siete veces superiores a la óptima. La concentración máxima aplicada de Fe generó la floculación inmediata de los filamentos e inhibió el crecimiento de la cianobacteria. Asimismo, el Fe indujo cambios morfológicos más notorios en condiciones de disponibilidad de N. Esta tesis muestra el efecto complejo que tiene el Fe en el crecimiento de una cianobacteria filamentosa, tóxica y fijadora de N_2 , pudiendo actuar tanto como inhibidor como estimulador del crecimiento. Estos resultados alertan sobre posibles efectos no deseados cuando se busca controlar una floración de cianobacterias mediante la aplicación de FeCl_3 en un lago, lo que podría producir una selección de organismos tolerantes al floculante y favorecer su dominancia a largo plazo.

Introducción

La eutrofización se define como el aumento de la producción primaria de un ecosistema acuático como consecuencia del enriquecimiento de las aguas superficiales con nutrientes, en particular fósforo (P) (Schindler, 1977). Esta fertilización puede darse de forma natural en la evolución de los lagos involucrando factores físicos, climáticos y biológicos (Fontúrbel, 2016). Sin embargo, desde la segunda mitad del siglo pasado el proceso de eutrofización se ha visto acelerado debido al aporte excesivo de nutrientes por fuentes antropogénicas (Paerl et al., 2011). El aporte puntual de las aguas servidas como consecuencia del crecimiento de centros urbanos (Dolbeth et al., 2003; Western, 2001), la descarga de efluentes industriales (Carpenter & Cottingham, 1997; Myrbo & Ito, 2003) y los aportes difusos de las actividades productivas a través del uso excesivo de fertilizante, la deforestación y la erosión de los suelos agrícolas (Downing & McCauley, 1992; Howarth et al., 1996) son algunas de las principales fuentes de aportes. En este escenario, el estado de equilibrio de los ecosistemas, su funcionamiento y los servicios ecosistémicos que proveen son alterados (Heisler et al., 2008). Una de las principales respuestas de los ecosistemas a la eutrofización es el aumento en la producción primaria de la comunidad fitoplanctónica, y en general, el crecimiento desmedido de cianobacterias (Paerl & Huisman, 2009), lo que resulta en un empobrecimiento de la diversidad ecosistémica (Sarhou, 2016) y en el deterioro de la calidad del agua.

Las floraciones de cianobacterias (*blooms* en inglés) son producto de un crecimiento abrupto de una o unas pocas especies de cianobacterias en un corto período de tiempo (Chorus & Bartram, 1999; Reynolds, 2006). Este fenómeno representa uno de los desafíos ecológicos más importantes de los sistemas límnicos a nivel mundial (Heisler et al., 2008). Las elevadas biomásas de cianobacterias que se dan durante una floración tiene consecuencias negativas sobre el ambiente, como la desoxigenación de las capas profundas de los cuerpos de agua, la generación de olor y sabor desagradable, y la potencialidad de producir potentes toxinas, lo que puede desencadenar en la muerte de peces y en la consecuente alteración de la cadena trófica y estructura comunitaria (Paerl et al., 2001; Lehman et al., 2010; Reynolds, 2006). A su vez, la presencia de dichas toxinas (cianotoxinas) en aguas con fines recreativos y para consumo puede tener efectos negativos sobre la salud humana (Chorus & Bartram, 1999; Paerl et al., 2001; Chorus & Walker, 2021). De esta forma, el ecosistema acuático pierde servicios ecosistémicos fundamentales y se restringe su uso como recurso, ya sea como fuente de agua para potabilizar, riego, pesca y/o recreación (Visser et al., 2005; Bonilla, 2009; Van de Waal et al., 2009; Paerl et al., 2011). En Uruguay, la eutrofización de los sistemas de agua dulce ha aumentado en los últimos tiempos como consecuencia de la creciente producción industrial, agrícola-ganadera y la urbanización (Rodríguez-Gallego, 2011; Bonilla et al., 2015; Aubriot

et al., 2017; Haakonsson et al., 2017). Este fenómeno ha llevado a un incremento en los casos de floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas en lagos, lagunas, embalses y playas de todo el territorio (Bonilla, 2009; Bonilla et al., 2015; Aubriot et al., 2020; Goyenola et al., 2021; Bonilla et al., 2021).

La aparición de floraciones en los cuerpos de agua depende de las condiciones ambientales, entre ellas la disponibilidad de luz (transparencia del agua), temperatura dentro de los rangos óptimos de crecimiento, altos tiempos de residencia del agua y disponibilidad de nutrientes (Schindler, 1977; Reynolds, 2006; Paerl & Huisman, 2009; Schindler et al., 2008; Conley et al., 2009; Liu et al., 2011; Dolman et al., 2012). Está bien documentado que el nitrógeno (N) y fósforo (P) son los factores desencadenantes de las floraciones de cianobacterias, ya que existe una relación positiva entre la concentración de nutrientes y la frecuencia e intensidad de las floraciones (Dolman et al., 2012). Sin embargo, la disponibilidad de N y P pueden no ser condiciones suficientes para que haya una floración, ya que algunos estudios muestran que las tasas de crecimiento y biomasa son independientes a los cambios en la concentración de P o N (Schindler, 2012; Auer et al., 1986), por lo que puede ocurrir que otros nutrientes limiten o co-limiten la producción de biomasa de fitoplancton en ambientes eutróficos (Arrigo, 2005).

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para el crecimiento de fitoplancton. Debido a su origen evolutivo, las cianobacterias presentan mayores requerimientos de Fe que las algas eucariotas (Sunda & Huntsman, 2015; Sorichetti et al., 2015). La importancia del hierro como factor limitante para la producción primaria ha sido enfatizada durante mucho tiempo, ya que la célula fotosintética requiere de éste elemento para el transporte de electrones durante la fotosíntesis y la respiración, la asimilación de nitrato y la fijación de N atmosférico (Rodhe, 1948; Gerloff & Skoog, 1957; Schelske, 1962). En este último proceso, el Fe es clave para la función de la enzima nitrogenasa encargada de la fijación de N atmosférico (Rueter & Petersen, 1987; Raven et al., 1999). Así, un aumento en la disponibilidad de hierro podría favorecer las floraciones de cianobacterias fijadoras de N atmosférico (Larson et al., 2015) debido al aumento en las tasas de crecimiento, fotosíntesis y fijación de N (Boyd & Abraham, 2001; Shi et al., 2012).

De manera contraria, diferentes estudios plantean que elevadas concentraciones de Fe pueden reducir el crecimiento de fitoplancton ya que puede interactuar con el P en condiciones aeróbicas, provocando el secuestro por adsorción del P a óxidos de Fe y su precipitación a los sedimentos (Gächter & Müller, 2003; Katsev et al., 2006). Debido a su capacidad de formar diversos compuestos con P soluble, el cloruro de hierro III (FeCl_3) se ha usado tradicionalmente para el tratamiento de aguas residuales (tratamiento terciario) y para la potabilización del agua

(Yeoman et al., 1988). Asimismo, el FeCl_3 forma parte de un conjunto de alternativas para controlar los niveles de P en los cuerpos de agua (Boers et al., 1992). Sin embargo, esta capacidad de unirse al fosfato se ve restringida por la ausencia de oxígeno y bajo pH debido a la reducción del ión férrico a ferroso que libera nuevamente el fosfato (Molot et al., 2014). Algunos estudios muestran que la eficiencia de FeCl_3 por capturar P en ambientes anóxicos sería mayor a la esperada debido a la circulación y oxidación del Fe en las capas superficiales, provocando la recaptura del fosfato (Kleeberg et al., 2013). Sin embargo, el aporte de FeCl_3 y por ende de Fe a cuerpos lénticos podría producir efectos complejos sobre las comunidades bióticas, especialmente sobre las cianobacterias que podrían beneficiarse con el Fe como micronutriente esencial (Chow et al., 1998; Larson et al., 2018).

Estos roles contrastantes del Fe, por un lado como un micronutriente importante para el crecimiento de fitoplancton y por otro como un sumidero o sedimentador de P, han generado modelos diferentes para el manejo de la eutrofización en agua dulce. Por más de cuatro décadas se han utilizado en todo el mundo sales de Fe como estrategia para reducir las concentraciones de P en lagos y embalses (Walker et al., 1989; Engstrom, 2005). Sin embargo, algunos autores sugieren que la sobrecarga de Fe en los cuerpos de agua debería replantearse ya que una alta disponibilidad de Fe podría favorecer la dominancia de cianobacterias (Molot et al., 2010; Xu et al., 2013).

Raphidiopsis raciborskii (anteriormente *Cylindrospermopsis raciborskii*) es una cianobacteria filamentosa fijadora de nitrógeno atmosférico y formadora de floraciones perteneciente al orden Nostocales (Aguilera et al., 2018; Padisák, 1997). Debido a su distribución global alrededor del mundo y alta toxicidad ha sido ampliamente estudiada por diferentes investigadores (Briand et al., 2004; Burford & O'donohue, 2006; Fabre, 2011; Piccini et al., 2011; Bonilla et al., 2012; Amaral et al., 2014). En particular, se ha determinado que las toxinas producidas por *R. raciborskii* son diversas y están relacionadas con su distribución geográfica (Vico et al., 2020). Por ejemplo, está bien documentado que en Europa y Australia *R. raciborskii* produce la cianotoxina cilindrospermopsina (Haande et al., 2008; Yilmaz et al., 2008), mientras que en Sudamérica las cepas de esta especie sintetizan saxitoxinas (Lagos et al., 1999; Piccini et al., 2011). Por otro lado, anteriormente se le adjudicó un comportamiento invasor ya que fue registrada por primera vez en 1912 en Java, Indonesia (región tropical) (Woloszynka, 1912) y posteriormente se encontraron registros en regiones templadas y subtropicales (Briand et al., 2004; Padisák, 1997) incluso dominando la comunidad fitoplanctónica (Vidal & Kruk, 2008; Paerl et al., 2011). Sin embargo, evidencia reciente sugiere una diversificación evolutiva temprana desde África tropical hacia el norte de África, la Europa mediterránea y América del Norte; adquiriendo la capacidad de producir diferentes toxinas luego de la expansión y

colonización de diferentes ambientes (Vico et al., 2020). Su extensa distribución sugiere que tiene una gran capacidad de adaptación fisiológica a diversos rangos de condiciones ambientales como disponibilidad de nutrientes, temperatura y luz (Briand et al., 2004; Bonilla et al., 2012; Amaral et al., 2014). Dicha capacidad adaptativa se ha visto reflejada a nivel morfo y fisiológico ya que se ha observado un buen comportamiento en un amplio rango de condiciones de luz y temperatura (Bonilla et al., 2012; Amaral et al., 2014), así como la capacidad de acumular gránulos de polifosfato como reserva de P, fijar nitrógeno atmosférico y sobrevivir a bajas concentraciones de nutrientes (Isvánovics et al., 2000; Ind et al., 2009). Otro aspecto que podría ser clave en el éxito de la expansión de *R. raciborskii* es la existencia de ecotipos (Chonudomkul et al., 2004) ya observados en dicha especie por Piccini et al. (2011). El hecho de que varias cepas de la especie difieren en sus preferencias lumínicas reflejan la existencia de ecotipos diferentes (Fabre, 2011). Todos estos atributos favorecen su dominancia en los cuerpos de agua (Kenesi et al., 2009).

En Uruguay, *Raphidiopsis raciborskii* ha sido registrada en ecosistemas acuáticos destinados a la potabilización y recreación (Vidal & Kruk, 2008; Fabre, 2011; Bonilla et al., 2012; González-Madina et al., 2022). A modo de ejemplo, *R. raciborskii* ha generado grandes floraciones productoras de saxitoxina en la Laguna del Sauce con grandes implicancias en la potabilización del agua (González-Madina et al., 2022). Debido a esto se han realizado varios experimentos en los que se ha visto que la especie presenta una gran plasticidad fenotípica que le permite aclimatarse a diferentes condiciones ambientales, como modificar la tasa de captación de fósforo según la disponibilidad en el ambiente (Amaral et al., 2014) y la temperatura (Galvanese et al., 2019) y ajustar la concentración de pigmentos frente a distintas condiciones de intensidad lumínica (Fabre, 2011). El análisis de una extensa base de datos realizado por Bonilla et al. (2012) refleja que dicha plasticidad de *R. raciborskii* favorece el éxito y colonización de la especie en ambientes menos enriquecidos con fosfato en comparación con otra cianobacteria filamentosa formadora de floraciones (*Planktothrix agardhii* (orden Oscillatoriales)).

Debido al incremento de las floraciones de cianobacterias, tanto en ecosistemas lénticos como lóticos de nuestro país (Bonilla & Conde, 2000; Vidal & Kruk, 2008; Fabre et al., 2010; Bonilla et al., 2015), el estudio de los aspectos ecofisiológicos que intervienen en el desarrollo de las floraciones adquiere relevancia a nivel local y global, así como la investigación de diversos procesos que mitiguen o rehabiliten los ecosistemas afectados por floraciones. Los atributos ecofisiológicos y morfológicos que presenta *R. raciborskii*, en particular relacionados a su capacidad de soportar bajas concentraciones de fosfato disponible y de fijar nitrógeno atmosférico, la convierte en un excelente organismo modelo para investigar el efecto del Fe en

el crecimiento y morfología de la especie. Estos atributos plantean un escenario incierto acerca del efecto de las aplicaciones de FeCl_3 en lagos para el control de floraciones de cianobacterias, ya que el floculante podría beneficiar especies resistentes a la escasez de fosfato y que tengan altos requerimientos de Fe, como podría ser el caso de *R. raciborskii*.

Objetivo

Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de hierro (FeCl_3) sobre las tasas de crecimiento y morfología de una cepa de *Raphidiopsis raciborskii* (MVCC19) en condiciones de fijación y no fijación de nitrógeno atmosférico.

Objetivos específicos

- Determinar el rango de concentraciones de FeCl_3 que resulte en estimulación e inhibición del crecimiento de *R. raciborskii* bajo condiciones óptimas de nutrientes.
- Evaluar el efecto del FeCl_3 en el crecimiento de *R. raciborskii* bajo fijación de N atmosférico.
- Analizar el efecto del FeCl_3 sobre la morfología de *R. raciborskii* en condiciones de fijación y no fijación de N atmosférico.

Materiales y Métodos

Condiciones de cultivo

Los experimentos se realizaron utilizando una cepa de *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) aislada de un lago artificial (Lago Javier, Canelones, Uruguay), cultivada en cámara de cultivo a una temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e intensidad de luz de $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con fotoperiodo de 16:8 h (luz:oscuridad) en la Sección Limnología (Facultad de Ciencias, Universidad de la República) y mantenida con medio BG11 modificado (Stanier et al., 1971). El código adjudicado a la cepa es MVCC19 y corresponde a un solo ecotipo según estudios moleculares (Piccini et al., 2011).

Condiciones de aclimatación a la deficiencia por Fe

Para evaluar el crecimiento en relación a la disponibilidad de Fe (en forma de FeCl_3) fue necesario inducir la deficiencia por este recurso previamente a la realización de cada experimento. Para poder obtener la relación atómica P:Fe deseada fue imprescindible aclimatar el cultivo a 1 mgP/L (32 $\mu\text{molP/L}$) y a $1/5$ el Fe de la concentración original en el BG11 (23.3 $\mu\text{molFe/L}$). Para ello se realizaron en paralelo, diluciones semanales con medio BG11 modificado con $1/5$ de Fe (4.66 $\mu\text{molFe/L}$) y 1 mgP (con y sin N inorgánico disuelto agregado dependiendo del experimento) en régimen semi-continuo con el fin de aclimatar los cultivos para la posterior realización de los cultivos madre. Dicha condición de aclimatación se sostuvo por dos meses con repiques bisemanales sucesivos previamente a la realización de los cultivos madre.

Diseño Experimental

Posteriormente a la aclimatación de los cultivos, se realizaron en paralelo dos experimentos con la cepa de *R. raciborskii*, cuya diferencia radicó solo en la presencia o ausencia de nitrógeno inorgánico (N) disuelto en el medio. De esta forma, el experimento denominado +N presentó nitrógeno inorgánico, mientras que el -N no.

Dichos experimentos presentaron cinco tratamientos con relaciones atómicas P:Fe diferentes (1:0; 1:1; 1:2; 1:5 y 1:10). Cada tratamiento fue realizado por triplicado (excepto el tratamiento 1:0, que contó con dos réplicas) generando un total de 14 muestras por experimento. Cada experimento tuvo una duración de 16 días ya que se ha descrito en bibliografía que es el tiempo que demora la cepa en llegar a finalizar la fase exponencial de crecimiento (Martigani, 2017).

Para ambos experimentos se realizó un cultivo de trabajo compuesto por 500 mL de cultivo de *R. raciborskii* previamente aclimatado y 1500 mL de medio de cultivo BG11 modificado sin hierro y 1 mgP (Stanier et al., 1971). El cultivo madre se repartió en volúmenes de 120 mL en matraces de 150 mL. Una vez realizada la división se adicionaron los diferentes volúmenes de FeCl_3 de una solución de trabajo de 15.12 mmolFe/L . El "control positivo" (C+) de inhibición del crecimiento (y control positivo del estado de deficiencia por Fe), no recibió FeCl_3 y se lo denominó tratamiento P:Fe 1:0 (C+). En los siguientes tratamientos se aplicaron 255 μl para el 1:1 (32 $\mu\text{molFe/L}$); 511 μl para 1:2 (64 $\mu\text{molFe/L}$); 1279 μl para 1:5 (160 $\mu\text{molFe/L}$); y 2559 μl para 1:10 (320 $\mu\text{molFe/L}$). El tratamiento 1:1 es el que se aproxima a la concentración de Fe

presente en el medio de cultivo BG11 completo (23.3 $\mu\text{molFe/L}$), por lo que se lo consideró como “control negativo” (C-) de la inhibición. Por lo tanto, los resultados esperados en función de los controles son:

- Crecimiento igual o menor al C+: efecto inhibitorio
- Crecimiento menor al C-: efecto inhibidor relativo
- Crecimiento mayor al C-: efecto estimulador

En ambos experimentos se utilizaron las mismas condiciones de luz y temperatura mencionadas anteriormente.

Determinación del crecimiento

La tasa de crecimiento μ fue determinada mediante la medición de la densidad óptica de cada réplica en ambos experimentos a 750 nm (DO_{750} , medida indirecta de biomasa) con espectrofotómetro (Thermo Scientific, Evolution 60 LC) desde el día cero (cultivo madre) y cada dos días hasta la finalización de cada experimento.

La tasa de crecimiento (μ) se calculó como:

$$\mu(\text{días}^{-1}) = (\ln\text{DO}_{750 \text{ final}} - \ln\text{DO}_{750 \text{ inicial}}) / \Delta t$$

Donde $\text{DO}_{750 \text{ final}}$ es la densidad óptica al final de la fase exponencial de la curva de crecimiento, $\text{DO}_{750 \text{ inicial}}$ es la densidad óptica 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. La DO_{750} pre experimental fue 0.125 ± 0.004 para el experimento +N y 0.225 ± 0.002 para el -N.

Para el análisis de resultados se definieron dos tasas de crecimiento por tratamiento: Inicial, o fase exponencial que abarca los primeros 6 días, y Final, desde el día 10 al 16 que refleja la fase de crecimiento exponencial y estacionaria. Se trabajó con el promedio de las réplicas por tratamiento.

Determinación de la morfología y biovolumen

Con la finalidad de cuantificar la biomasa de la cepa MVCC19 y comparar la morfología de los tricomas de *R. raciborskii* en función de cada tratamiento, se extrajeron muestras (5 mL) de

cada réplica cada 4 o 5 días desde el inicio (cultivo madre) hasta el final de cada experimento. Las muestras fueron fijadas con lugol y conservadas en oscuridad hasta su procesamiento.

La abundancia de organismos (org/mL) fue cuantificada según Sournia (1979) y Hotzel & Croome (1999) utilizando cámaras de sedimentación Sedwick - Rafter de 1 mL a un aumento de 400 veces en microscopio óptico invertido Olympus CKX41 y microscopio óptico Olympus BX40. El conteo se realizó por campos al azar hasta alcanzar 100 individuos, excepto en la réplica b del tratamiento 1:1 del experimento +N (Día 14) donde se cuantificaron todos los individuos de la cámara debido a la baja abundancia encontrada.

Los parámetros morfológicos de los individuos fueron determinados midiendo el ancho (aumento 1000X) y largo del filamento (aumento 400X). A su vez, se cuantificaron y midieron (ancho y largo) las células especializadas: heterocitos y acinetes presentes.

El volumen de los individuos de cada réplica (mm^3) se calculó a partir de las medidas de 30 individuos (largo y ancho) y aproximando cada filamento a la figura geométrica de un cilindro (Hillebrand et al., 1999). El biovolumen de cada réplica fue estimado multiplicando la abundancia por el volumen promedio de los mismos de acuerdo a Hillebrand et al. (1999).

A partir de los valores de abundancia y biovolumen de cada réplica, se calculó mediante un promedio de las tres réplicas, la abundancia y biovolumen de cada tratamiento para cada tiempo.

Determinación de nutrientes

El contenido de N y P de los organismos se determinó al finalizar cada experimento, filtrando una alícuota de volumen conocido de cada réplica a través de un filtro de fibra de vidrio MGF Munktell. Una vez filtrada la muestra, se lavó el filtro y el material retenido con agua milliQ. Los filtros con el material retenido fueron preservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización del análisis químico.

Se determinó el contenido de fósforo (para ambos experimentos) y nitrógeno (solo experimento -N) particulado en el cultivo (PP y NP, respectivamente) retenido en los filtros, por oxidación de la materia orgánica según Valderrama (1981). A partir de la muestra resultante luego del filtrado y mediante el método de azul de molibdeno (Murphey & Riley, 1962), se cuantificó la concentración de fósforo reactivo soluble (PRS) para ambos experimentos.

Por último, se estimó la cuota de fósforo y nitrógeno a partir de la concertación de nutrientes en forma particulada y normalizada por unidad de biomasa como:

$$\text{Cuota celular de P o N } (\mu\text{g}/\text{mm}^3) = [\text{PP o NP}] (\mu\text{g}/\text{L}) / \text{BV} (\text{mm}^3/\text{L})$$

Donde [] corresponde a la concentración del nutriente (N o P) particulado y BV al biovolumen, ambos para cada réplica. Se trabajó con el promedio de las réplicas por tratamiento.

Análisis de datos

Con la finalidad de que todos los tratamientos contengan la misma cantidad de réplicas (3), se generó una réplica artificial (promedio de las réplicas existentes de cada tratamiento) para los casos en que se perdió alguna réplica. Dado que los datos no siempre cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se realizaron pruebas no paramétricas Kruskal - Wallis (se comparan las medianas de los grupos) y test post - hoc Tukey (disponible en Sigma Plot para análisis no paramétricos) donde se comparan las medias de los rangos de los grupos. En los casos donde sí se cumplieron los supuestos, se realizaron pruebas paramétricas ANOVA y test post- hoc Tukey, con el fin de comparar las medias de los grupos (Tratamientos o días de experimento).

Respecto al tercer objetivo, se analizó la relación entre las variables morfológicas (largo y ancho) y el volumen de los organismos y se caracterizó la presencia de células especializadas en los tratamientos. Debido a que las variables morfológicas de los organismos y la abundancia de *R. raciborskii* no cumplieron con los supuestos de normalidad, se realizaron (para cada experimento) pruebas no paramétricas de Kruskal - Wallis y test post hoc Dunn's con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos para los días 5 y 14.

Todos los análisis descritos se realizaron usando SigmaPlot (versión 11.0).

Resultados

Floculación de *R. raciborskii* bajo condiciones óptimas de nutrientes y fijación de N_2

La adición de $320 \mu\text{mol Fe L}^{-1}$ (concentración máxima de Fe) correspondiente al tratamiento 1:10, desencadenó inmediatamente la floculación y sedimentación de los filamentos que se

encontraban en suspensión tanto para el experimento +N (Fig. 1A), como -N (Fig. 1B). El resto de los tratamientos (1:1, 1:2 y 1:5) no provocó la floculación del cultivo.

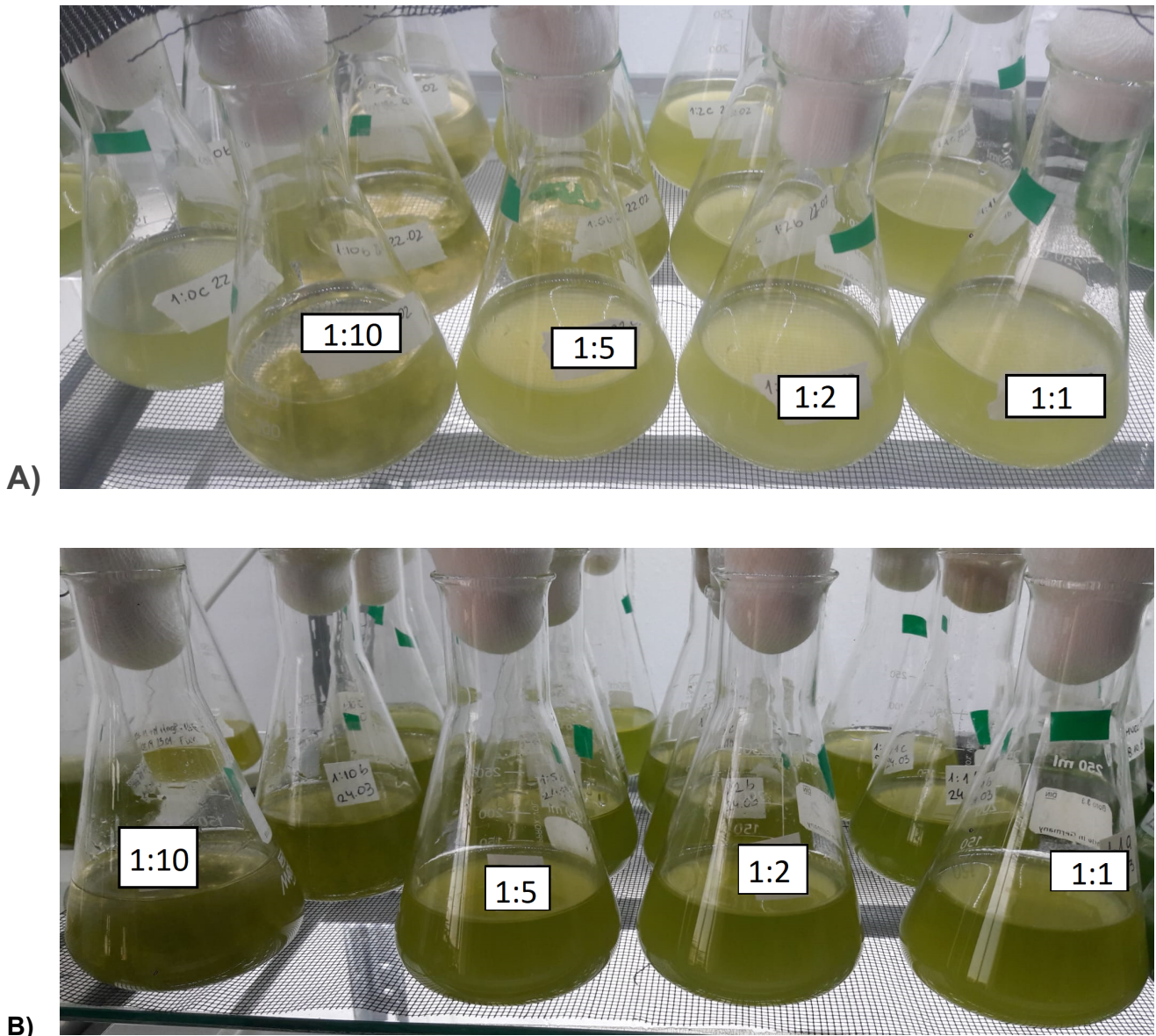


Figura 1. Fotografía de los tratamientos al inicio de cada experimento. (A) corresponde a los tratamientos del experimento +N, mientras que (B) al experimento -N. Para ambos experimentos se observan, de izquierda a derecha los tratamientos 1:10, 1:5, 1:2 y 1:1.

Efecto del FeCl_3 en el crecimiento de *R. raciborskii* en condiciones óptimas de nutrientes

Se observó un aumento del crecimiento (DO) de *R. raciborskii* en respuesta a la adición de cloruro férrico en condiciones óptimas de cultivo (+N) para los tratamientos 1:1 (C-), 1:2 y 1:5

(Fig. 2). Los tratamientos 1:2 y 1:5 presentaron una respuesta mayor en el incremento de la biomasa en comparación al resto, mientras que en 1:10 no se detectó crecimiento (Fig. 2).

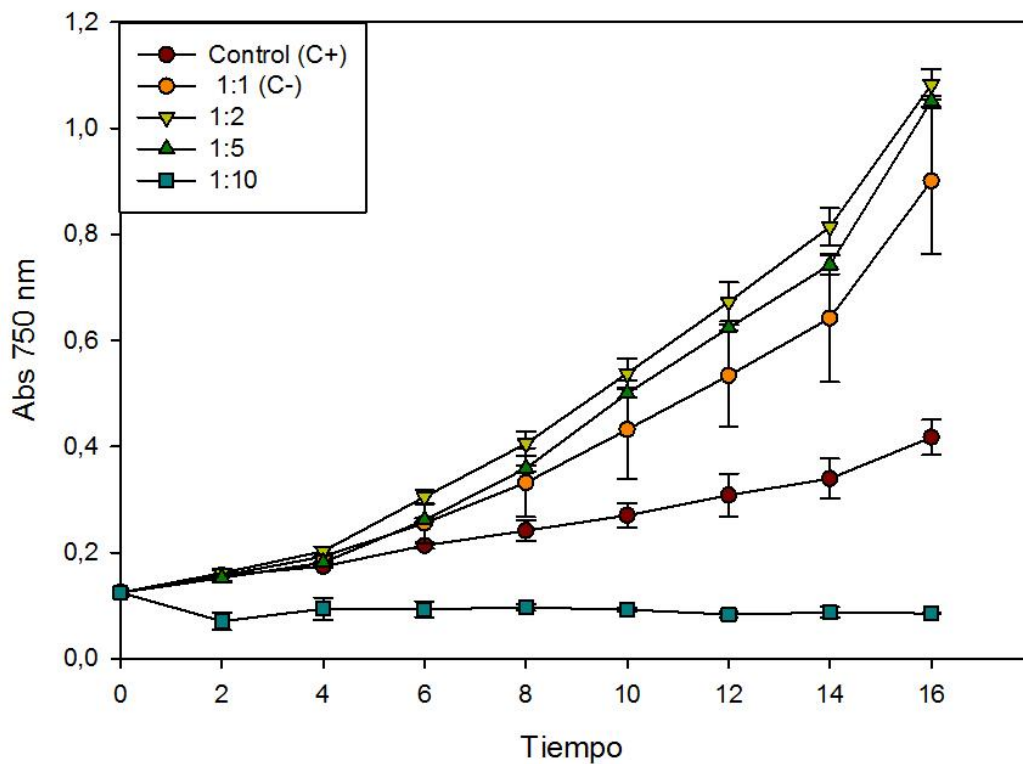


Figura 2. Variación de la densidad óptica (DO, Absorbancia a 750 nm) como indicador de biomasa de *R. raciborskii* en función de los días para cada tratamiento sometido a condiciones óptimas de nutrientes (+N). La Fase inicial abarca los primeros 6 días, mientras que la Fase Final desde el día 10 al 16. Los símbolos indican el promedio de cada tratamiento en cada tiempo y las líneas verticales representan el desvío estándar para cada caso (n=3).

Las tasas de crecimiento en la fase inicial presentaron diferencias significativas entre los tratamientos 1:2 y 1:10 (Kruskal -Wallis, $p = 0.012$). La mayor tasa de crecimiento se registró en el tratamiento 1:2 que presentó valor $\mu = 0.1450 \text{ d}^{-1}$, mientras que la menor fue para el tratamiento 1:10 ($\mu = -0.0307 \text{ d}^{-1}$, Fig. 3). El análisis ANOVA no reflejó diferencias significativas entre los tratamientos 1:1 (C-), 1:2 y 1:5 de la fase final, sin embargo, estos sí se diferenciaron del 1:0 (C+) y del tratamiento 1:10 ($p \leq 0.001$, Fig. 3). Puede destacarse una disminución en la tasa de crecimiento del tratamiento 1:2 entre la fase inicial y final, mientras que el tratamiento 1:10 presentó la respuesta contraria (Fig. 3).

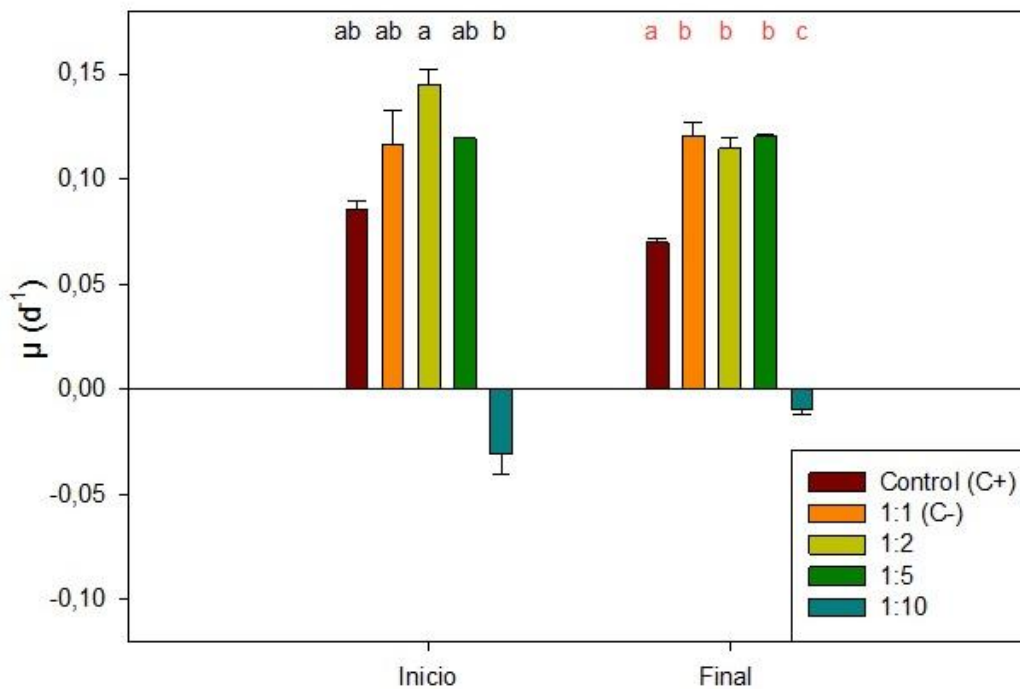


Figura 3. Tasa de crecimiento (μ) de cada tratamiento para la Fase Inicial y Final sometido a condiciones óptimas de nutrientes (+N). En negro se ven los resultados de la Prueba Tukey que compara los tratamientos para la Fase Inicial (Kruskal - Wallis $p = 0.012$), mientras que en rojo los resultados que compara los tratamientos de la Fase Final (ANOVA, $p \leq 0.001$). Los grupos marcados con las mismas letras no presentaron diferencias significativas. Las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso ($n=3$).

Para todos los tratamientos sometidos a condiciones +N, el biovolumen de *R. raciborskii* aumentó en el tiempo (Fig. 4). El análisis ANOVA realizado para ambos días y el post-hoc Tukey, reflejó que en el día 5, el tratamiento 1:0 (C+) presentó los mayores valores de biovolumen en comparación con el resto ($p = 0.008$, Fig. 4). Mientras que para el día 14, existieron diferencias significativas entre todos los tratamientos, con 1:1 (C-) y 1:2 como los tratamientos que presentaron biovolumenes más altos (dos órdenes de magnitud más que al inicio del experimento; $p \leq 0.001$; Fig. 4).

El análisis Kruskal - Wallis y su post-hoc Tukey respecto a la concentración de fósforo reactivo soluble (PRS) presente al final del experimento reflejaron diferencias significativas entre el tratamiento 1:5 y 1:1 (C-) ($p = 0.032$, Fig. 5). La concentración mayor de PRS se vio en el tratamiento 1:5 ($41.4 \pm 2.1 \mu\text{gP/L}$), mientras que 1:1 (C-) presentó el valor más bajo ($20.8 \pm 2.8 \mu\text{gP/L}$, Fig. 5). El resto de los tratamientos no registraron diferencias significativas (Fig. 5).

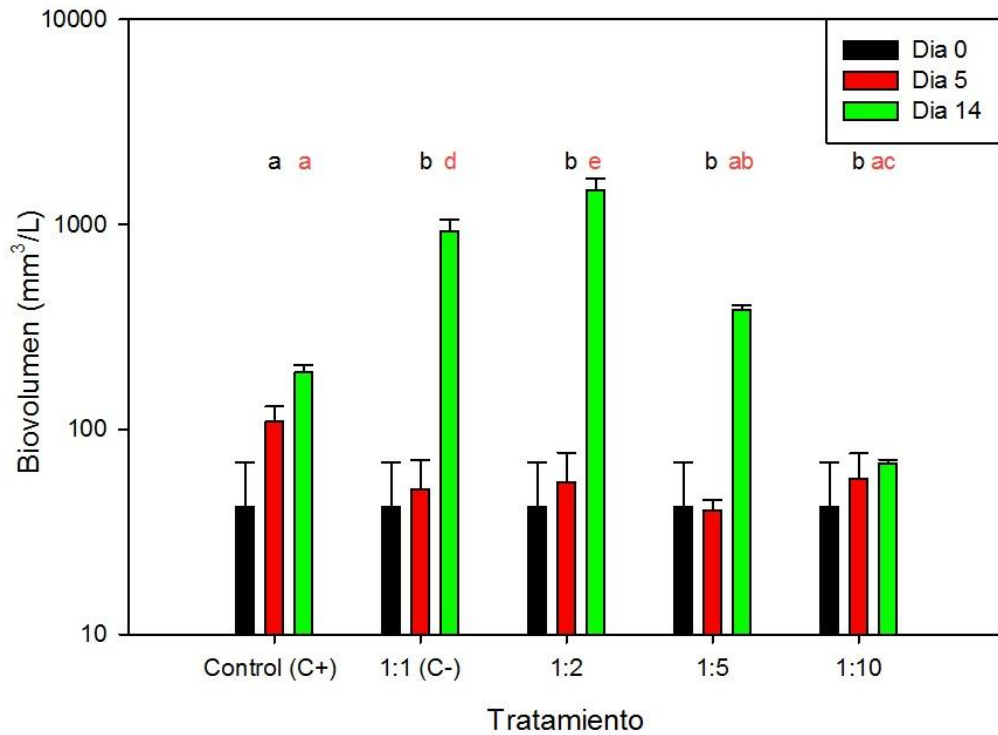


Figura 4. Biovolumen de *R. raciborskii* para cada tratamiento de P:Fe y sometido a condiciones óptimas de nutrientes (+N) (eje y en escala logarítmica). Las barras representan los días 0, 5 y 14 del experimento. En negro se indican los resultados de la Prueba Tukey que compara los tratamientos para Día 5 (ANOVA, $p = 0.008$), mientras que en rojo para Día 14 (ANOVA, $p \leq 0.001$). Los grupos marcados con las mismas letras no presentaron diferencias significativas. Las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso ($n=3$).

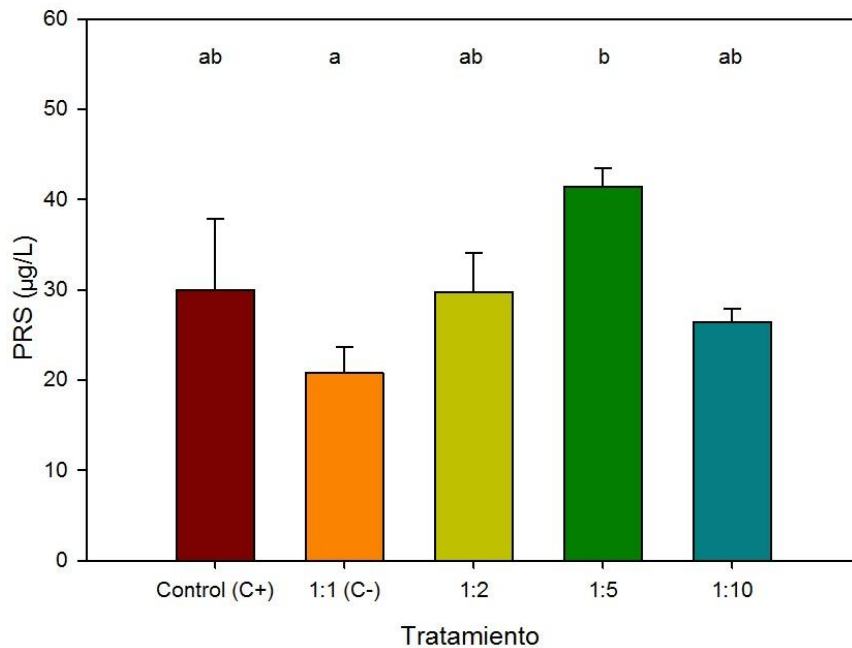


Figura 5. Concentración de Fósforo reactivo soluble (PRS) al finalizar el experimento en función de los tratamientos de P:Fe y sometido a condiciones óptimas de cultivo (+N). Los grupos marcados con las mismas letras indican que no existieron diferencias significativas según los resultados de la prueba de Tukey (Kruskal - Wallis, $p = 0.032$). Las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso ($n=3$).

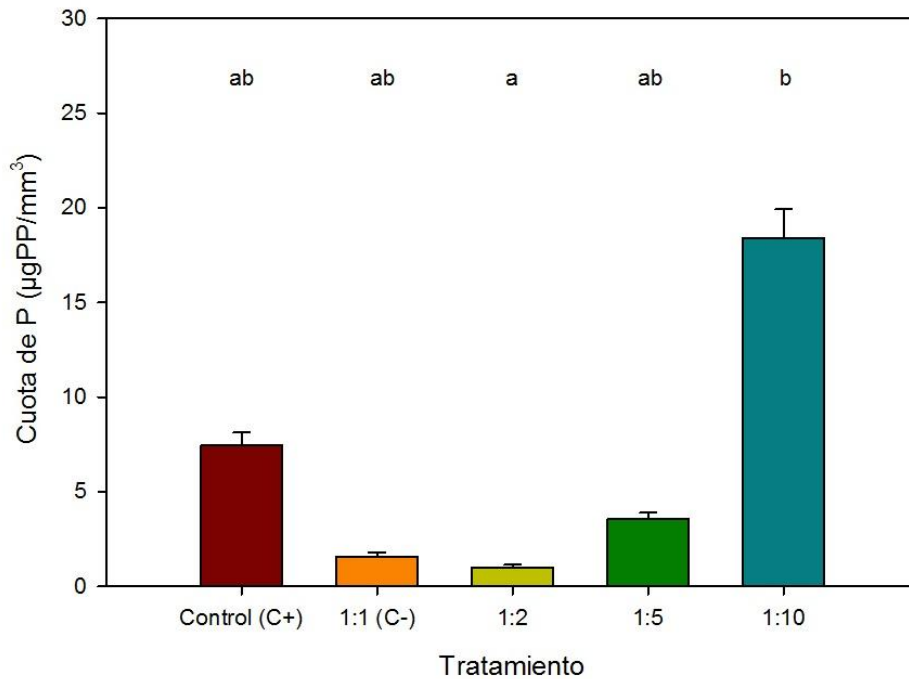


Figura 6. Cuota celular de P al finalizar el experimento por unidad de biovolumen ($\mu\text{gPP}/\text{mm}^3$) en función de los tratamientos sometidos a condiciones óptimas de nutrientes (+N). Los grupos marcados con las mismas letras indican que no existieron diferencias significativas según los resultados de la prueba de Tukey (Kruskal - Wallis, $p = 0.009$). Las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso ($n=3$).

La cuota de P por unidad de biovolumen, varió según el tipo de tratamiento (Fig. 6). El tratamiento 1:10 presentó el valor más alto de concentración ($18.4 \pm 1.5 \mu\text{g PP}/\text{mm}^3$), mientras que 1:2 el más bajo ($1.0 \pm 0.1 \mu\text{g PP}/\text{mm}^3$, Fig. 6). Los resultados del análisis Kruskal - Wallis y el post-hoc Tukey reflejan diferencias significativas solo entre estos tratamientos ($p = 0.009$, Fig. 6).

Efecto del FeCl_3 en el crecimiento de *R. raciborskii* bajo fijación de N_2

En condiciones deficientes de nitrógeno (-N) y frente a la adición de cloruro férrico, *R. raciborskii* presentó un incremento de la biomasa en los tratamientos 1:1 (C-) y 1:2 (Fig. 7). El tratamiento con mayor crecimiento (DO) fue el control negativo 1:1 (C-), mientras que 1:5 y 1:10 mostraron una inhibición total (Fig. 7). En el día 8, todos los tratamientos presentaron un aumento proporcional e inusual de la densidad óptica lo que se interpreta como un error en la medición. Por tanto, los datos fueron considerados "atípicos" a la tendencia.

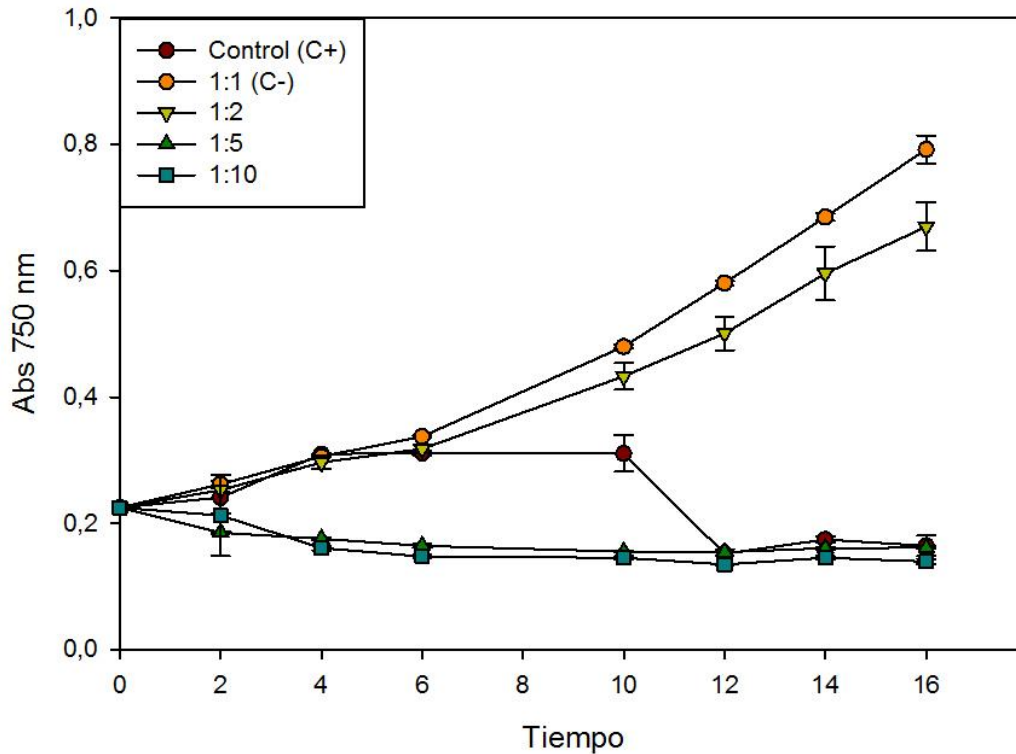


Figura 7. Variación de la densidad óptica (DO, Absorbancia a 750 nm) como indicador de biomasa de *R. raciborskii* en función de los días para cada tratamiento sometido a condiciones deficientes de Nitrógeno (-N). La Fase inicial abarca los primeros 6 días, mientras que la Fase Final desde el día 10 al 16. Los símbolos indican el promedio de cada tratamiento en cada tiempo y las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso (n=3). Se eliminó el día 8 debido a un posible error en la medición de la DO.

El análisis Kruskal - Wallis y el post-hoc Tukey realizado sobre la fase inicial de crecimiento mostraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento en los tratamientos 1:1 (C-) y 1:10 ($p = 0.012$, Fig. 8). La mayor tasa de crecimiento durante la fase inicial del experimento se registró en el tratamiento 1:1 (C-) con un valor $\mu = 0,069 \text{ d}^{-1}$, mientras que la menor fue para el tratamiento 1:10 ($\mu = -0,076 \text{ d}^{-1}$, Fig. 8). Respecto a la fase final, se observó diferencias significativas entre 1:0 (C+) y los tratamientos 1:1 (C-) y 1:2 ($p = 0.012$, Fig. 8). Sin embargo, 1:1 (C-) y 1:2 no presentaron diferencias significativas entre sí según la prueba post - hoc de Tukey ($p = 0.012$, Fig. 8). Se destaca el notorio descenso en la tasa de crecimiento de 1:0 (C+) entre la fase inicial y final y las tasas de crecimiento prácticamente nulas de los tratamientos 1:5 y 1:10 (Fig. 8).

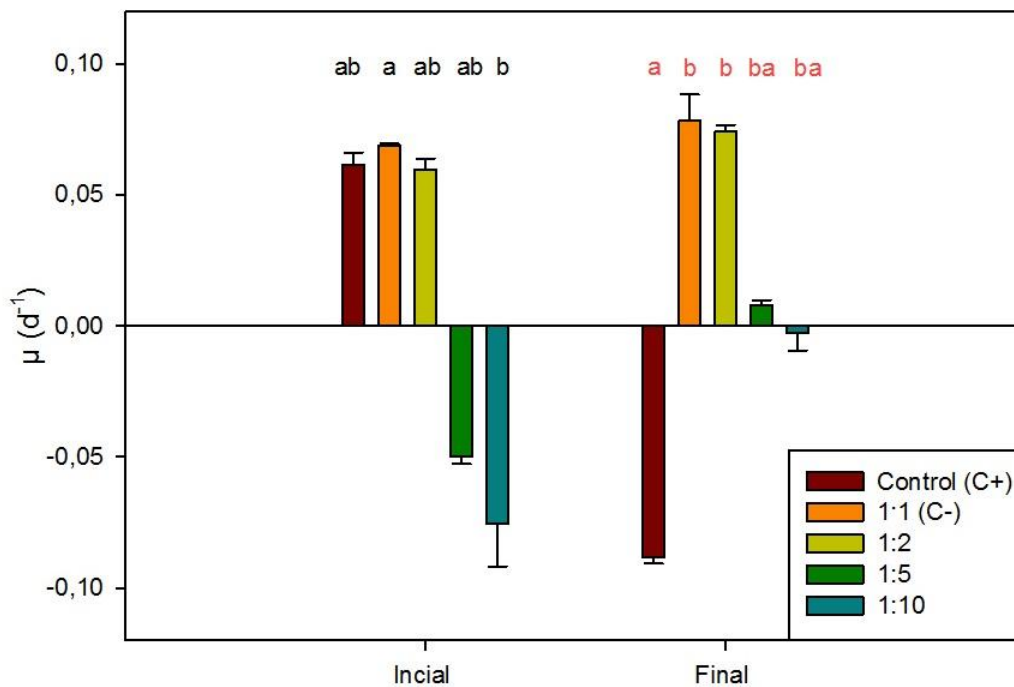


Figura 8. Tasa de crecimiento (μ) de cada tratamiento sometido a condiciones deficientes de Nitrógeno (-N) en la etapa inicial y final del experimento. En negro se ven los resultados de la Prueba Tukey que compara los tratamientos para la Fase Inicial (Kruskal - Wallis, $p = 0.012$) mientras que en rojo los resultados que compara los tratamientos de la Fase Final (Kruskal- Wallis, $p = 0.012$). Los grupos marcados con las mismas letras no presentaron diferencias significativas. Las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso ($n=3$).

El biovolumen de *R. raciborskii* sometidos a condiciones deficientes de nitrógeno varió a lo largo del experimento (Fig. 9). El análisis Kruskal-Wallis para el Día 5 no reflejó diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0.098$, Fig. 9). Sin embargo, existieron diferencias significativas entre el tratamiento 1:0 (C+) y el 1:2 según la prueba Kruskal-Wallis y test post-hoc Tukey en el Día 14 ($p = 0.010$, Fig. 9). El tratamiento 1:2 presentó los valores más altos de biovolumen en comparación con el resto de los tratamientos en el Día 14, siendo un orden de magnitud mayor que al inicio del experimento (Fig. 9). Mientras que 1:0 (C+) mostró una disminución respecto al Día 5, obteniendo el valor más bajo de biovolumen (Fig. 9).

El análisis de Kruskal - Wallis y el post-hoc Tukey respecto a la concentración de fósforo reactivo soluble (PRS) presente al final del experimento reflejó diferencias significativas entre el tratamiento 1:2 y 1:5 ($p = 0.022$, Fig. 10). La concentración mayor se observó en el tratamiento 1:2 ($72.8 \pm 32.4 \mu\text{gP/L}$), mientras que 1:5 presentó el valor más bajo ($33.1 \pm 3.6 \mu\text{gP/L}$, Fig. 10). El resto de los tratamientos no registraron diferencias significativas (Fig. 10).

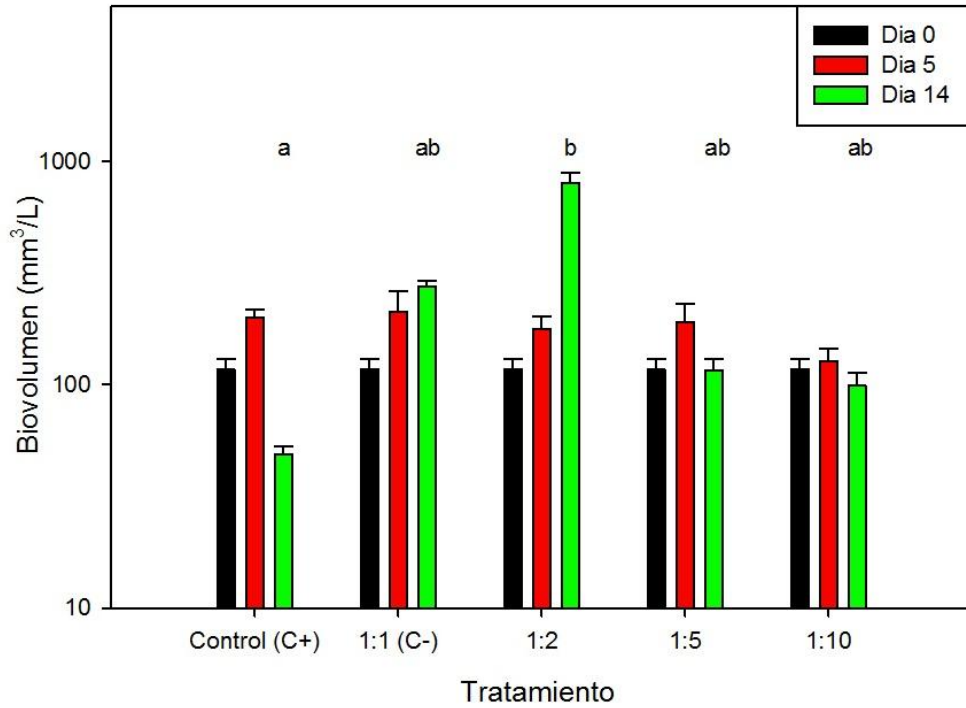


Figura 9. Biovolumen de *R. raciborskii* para cada tratamiento de P:Fe y sometido a deficiencia de Nitrógeno (-N) (eje y en escala logarítmica). Las barras indican los días del experimento. En negro se ven los resultados de la Prueba Tukey que compara los tratamientos para Día 14 (Kruskal - Wallis, $p = 0.010$), mientras que Día 5 no presentó diferencias significativas entre tratamientos (Kruskal - Wallis, $p = 0.098$). Los grupos marcados con las mismas letras indican que no existieron diferencias significativas según los resultados de la prueba de Tukey. Las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso ($n=3$).

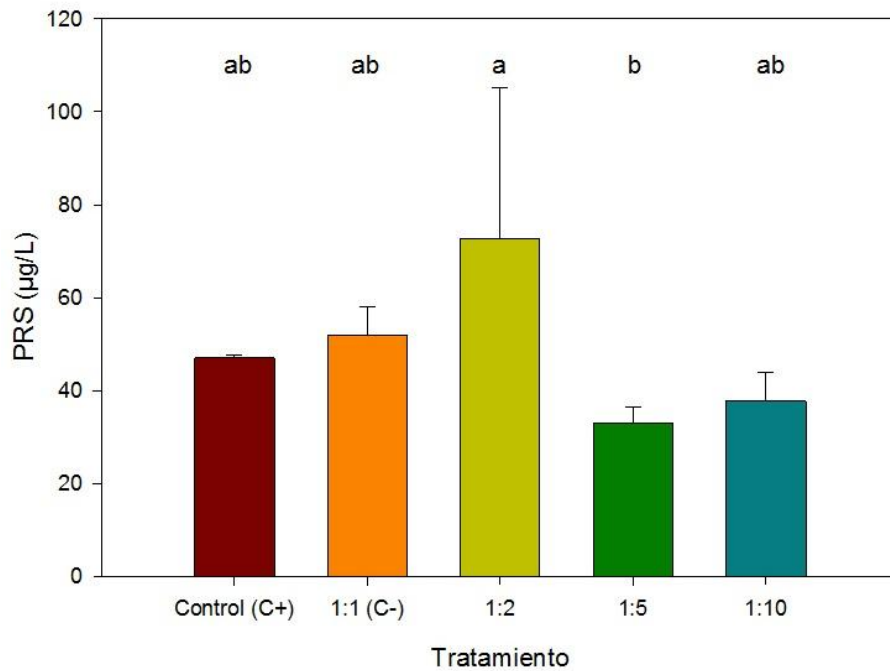


Figura 10. Fósforo reactivo soluble (PRS) al finalizar el experimento de cada tratamiento sometido a deficiencia de Nitrógeno (-N). Los grupos marcados con las mismas letras no presentaron diferencias significativas según los resultados de la prueba de Tukey (Kruskal - Wallis, $p = 0.022$). Las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso ($n=3$).

El análisis Kruskal - Wallis respecto a la cuota de P por unidad de biovolumen reflejó una variación según el tipo de tratamiento, siendo 1:0 (C+) el que presentó la concentración más alta respecto al resto ($48.68 \pm 15.76 \mu\text{gPP}/\text{mm}^3$, Fig. 11). Mientras que 1:2 presentó la menor cuota ($2.56 \pm 0.65 \mu\text{g P}/\text{mm}^3$, Fig. 11). Los resultados de la prueba Tukey reflejaron diferencias significativas solo entre estos tratamientos ($p = 0.012$, Fig. 11).

La cuota celular de N (Nitrógeno particulado por unidad de biovolumen) varió según el tipo de tratamiento (Fig. 12). 1:0 (C+) presentó la mayor concentración de Nitrógeno en comparación con el resto ($453.2 \pm 198.9 \mu\text{gN}/\text{mm}^3$, Fig. 12). Mientras que el tratamiento 1:10 presentó la menor ($61.1 \pm 11.3 \text{ N } \mu\text{gN}/\text{mm}^3$, Fig. 12). Los resultados de la prueba Tukey reflejan diferencias significativas solo entre estos tratamientos ($p = 0.017$, Fig. 12).

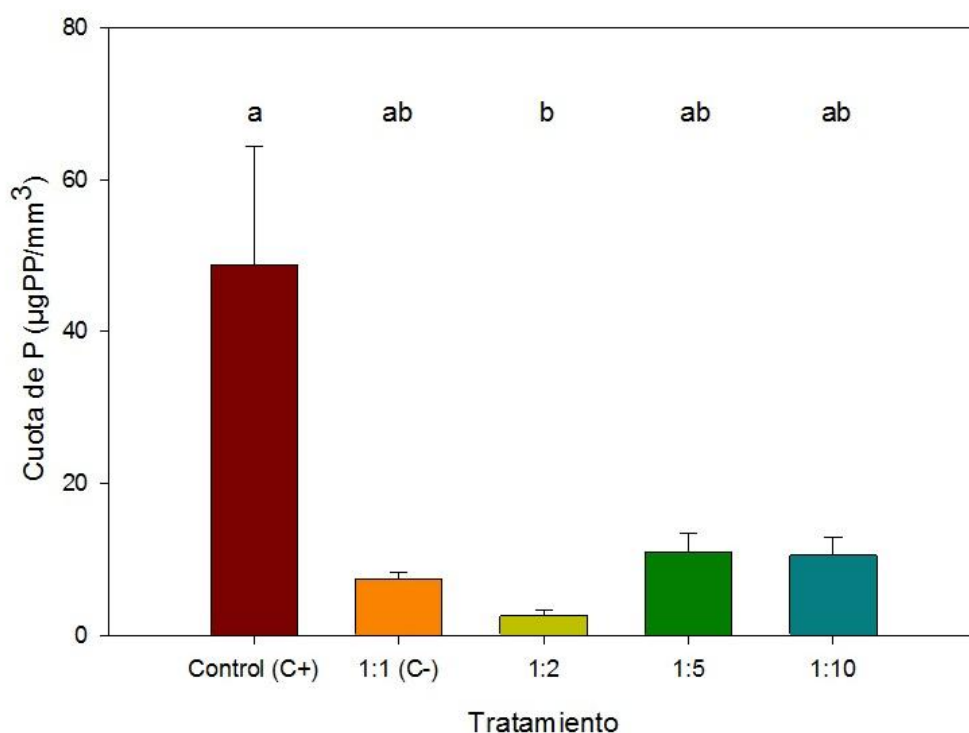


Figura 11. Cuota celular de P (PP) al finalizar el experimento por unidad de biovolumen ($\mu\text{gPP}/\text{mm}^3$) en los tratamiento P:Fe y sometido a deficiencia por Nitrógeno (-N). Los grupos marcados con las mismas letras no presentaron diferencias significativas según los resultados de la prueba de Tukey (Kruskal - Wallis, $p = 0.012$). Las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso ($n=3$).

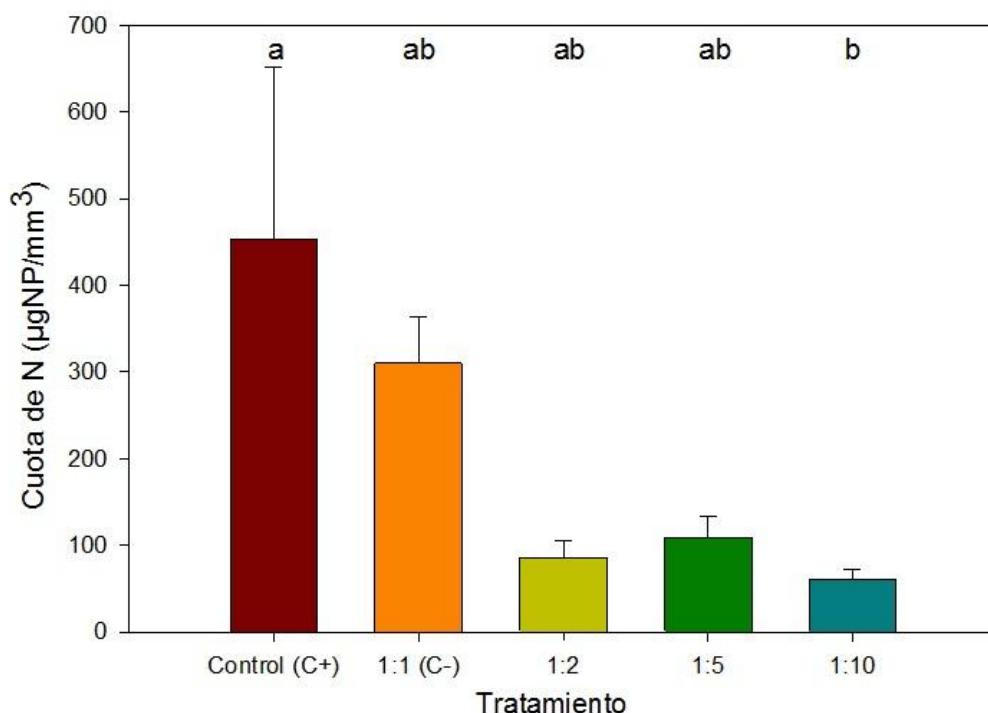


Figura 12. Cuota celular de N (NP) por unidad de biovolumen ($\mu\text{gN}/\text{mm}^3$) en los tratamientos P:Fe y sometidos a deficiencia por Nitrógeno (-N). Los grupos marcados con las mismas letras no presentaron diferencias significativas según los resultados de la prueba de Tukey (Kruskal - Wallis, $p = 0.017$). Las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso ($n=3$).

Respuesta morfológica de *R. raciborskii* bajo condiciones óptimas de nutrientes y fijación de N_2

Los filamentos de *R. raciborskii* fueron rectos y sin vaina mucilaginosa. El ancho de los organismos no exhibieron variaciones en función de los tratamientos, presentando un valor promedio de $2.497 \pm 0.018 \mu\text{m}$ para ambos experimentos. Se observó una relación de proporcionalidad entre el volumen (Tabla A1) y largo de los organismos tanto en condiciones óptimas de cultivo (Fig. A1) como en deficiencia de nitrógeno (Fig. A2), con coeficientes de determinación de 0.999 para el experimento +N y 0.998 para -N. Debido a este excelente ajuste entre volumen y largo de los filamentos, solo se reportó el análisis estadístico sobre el largo de los organismos.

En el experimento +N, el largo de los organismos aumentó en función de las concentraciones adicionales de FeCl_3 (Fig. 13, Tabla A2). De esta forma, el tratamiento 1:10 presentó el largo promedio mayor, mientras que el 1:0 (C+) el menor ($p \leq 0.001$, Fig. 13, Tabla A2). Estas diferencias se acentuaron con el tiempo, por lo que en el Día 14 se observaron tres grupos estadísticamente diferentes: a) tratamiento 1:0 (C+) y 1:1 (C-), b) tratamiento 1:2, y c) tratamientos 1:5 y 1:10 ($p \leq 0.001$; Fig. 13, Tabla A2).

Frente a la deficiencia de nitrógeno, el largo de los filamentos fue más similar entre los tratamientos, sin grandes variaciones durante el Día 5 y con un promedio de largo menor al finalizar el experimento (Día 14; Fig. 13, Tabla A2). El análisis Kruskal-Wallis y post-hoc Dunn's diferenció para el Día 14, tres grupos: a) 1:0 (C+), b) tratamientos 1:1 (C-), 1:5 y 1:10, y c) tratamiento 1:2 ($p \leq 0.001$; Fig. 13, Tabla A2). El menor largo promedio se observó en el grupo a), mientras que el b) presentó el mayor largo promedio ($p \leq 0.001$; Fig. 13, Tabla A2).

El largo promedio de filamentos al inicio del experimento +N fue de $172.36 \pm 68.55 \mu\text{m}$, mientras que para el experimento sin nitrógeno fue $253.90 \pm 106.71 \mu\text{m}$.

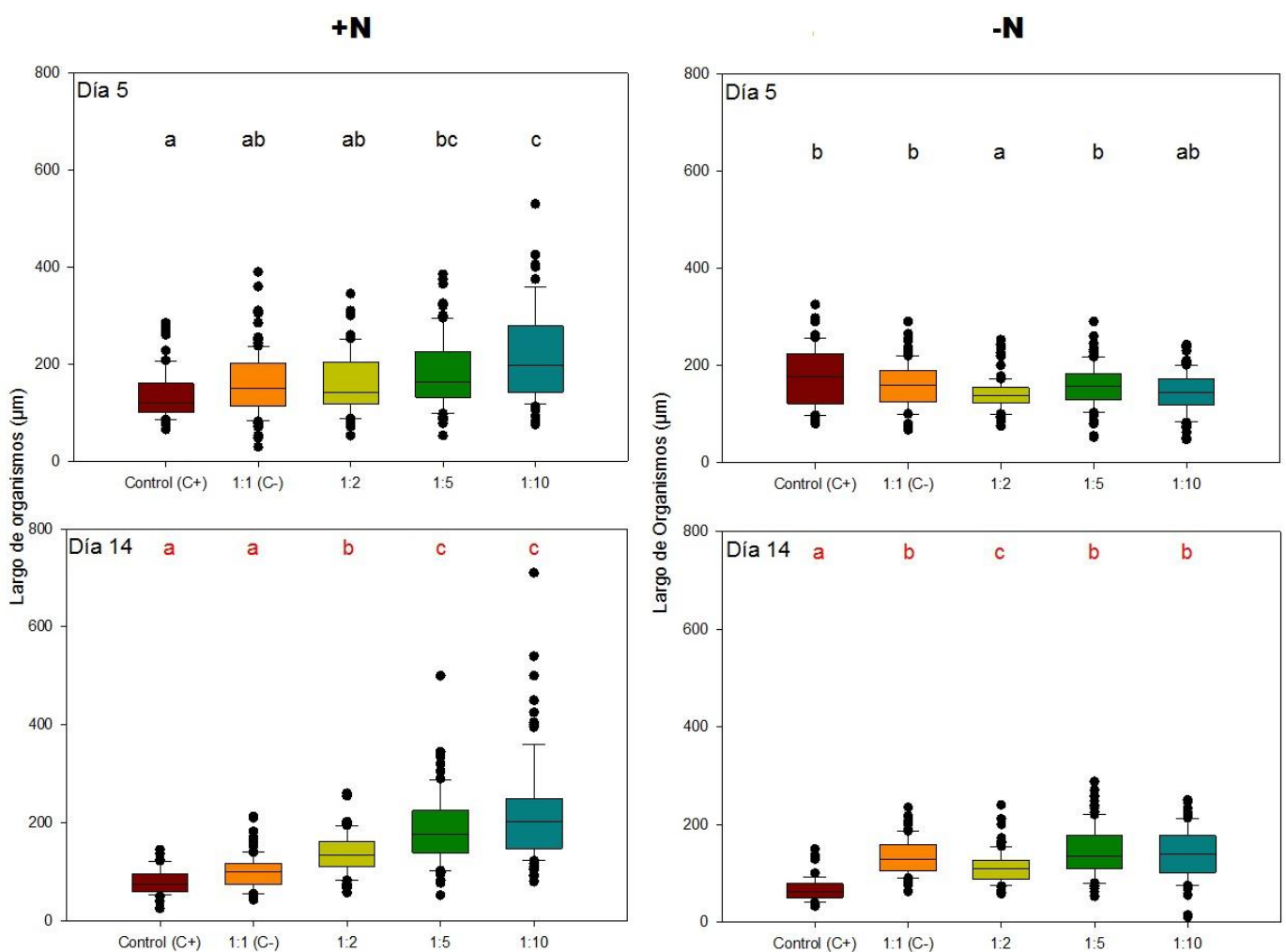


Figura 13. Largo de los filamentos de *R. raciborskii* durante el transcurso del experimento para cada tratamiento sometido a condiciones óptimas de nutrientes (+N) y deficiencia de nitrógeno (-N). En negro y rojo se ven los resultados de la Prueba Dunn's (Kruskal-Wallis, $p \leq 0.001$) para día 5 y 14 respectivamente para cada experimento. Los grupos marcados con las mismas letras no presentaron diferencias significativas. Las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso ($n=3$).

Para todos los tratamientos sometidos a condiciones +N excepto el 1:10, la abundancia de *R. raciborskii* aumentó en el tiempo (Fig. 14, Tabla A2). De esta forma, en el Día 14, los tratamientos 1:0 (C+) y 1:5 presentaron dos órdenes de magnitud más que al inicio del experimento, mientras que 1:1 (C-) y 1:2 exhibieron tres órdenes de magnitud superiores (Fig. 14, Tabla A2).

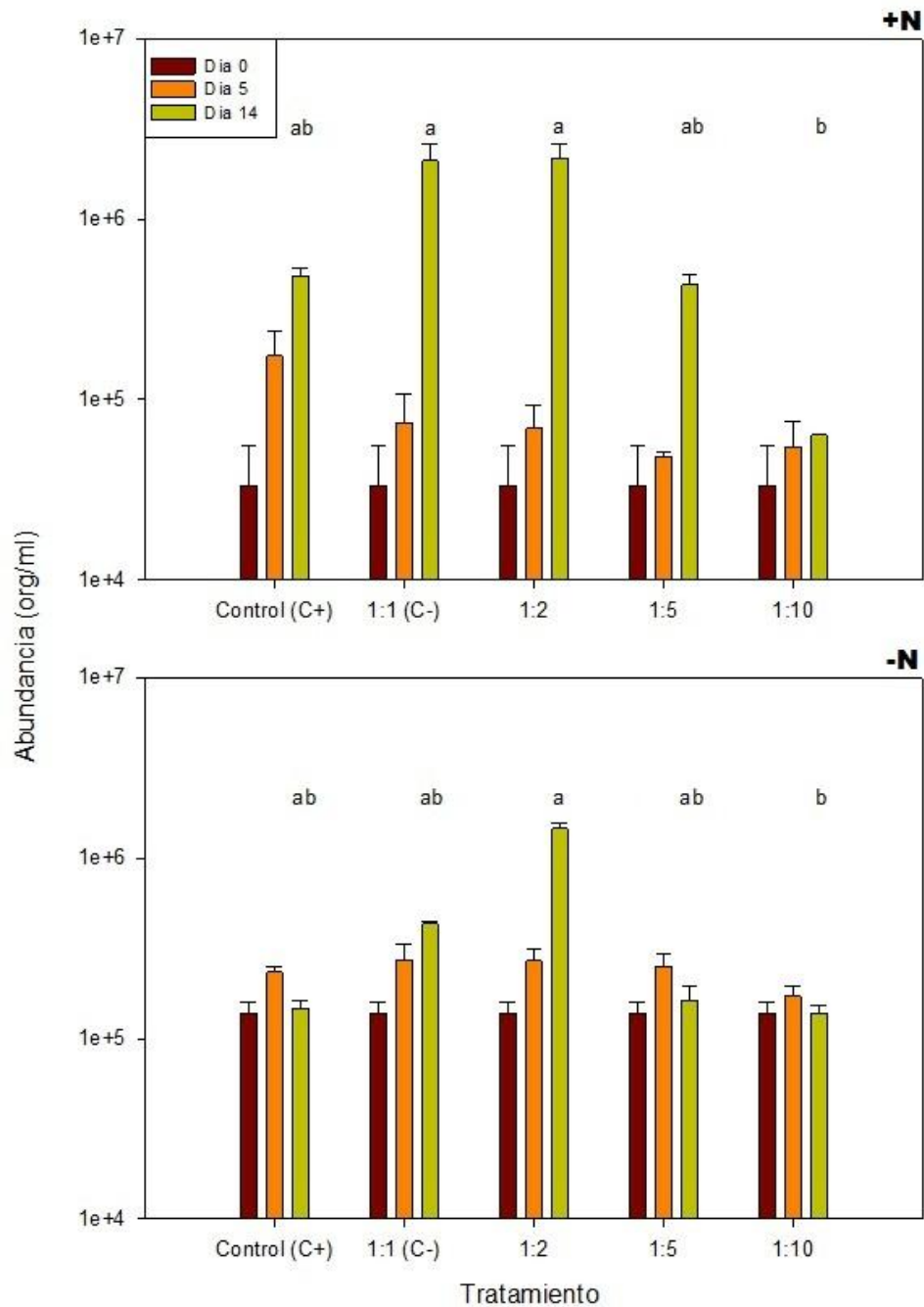


Figura 14. Abundancia de organismos de *R. raciborskii* durante el transcurso del experimento para cada tratamiento sometido a condiciones óptimas de cultivo (panel superior) y ausencia de nitrógeno (panel inferior). En negro se ven los resultados de la Prueba Dunn's (Kruskal - Wallis, $p = 0.015$ y $p = 0.023$) para día 14 de experimento +N y -N respectivamente. Tanto el día 5 de experimento +N ($p = 0.118$) como el de -N no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.106$). Los grupos marcados con las mismas letras no presentaron diferencias significativas. Las líneas verticales en cada barra representan el desvío estándar para cada caso ($n=3$).

El análisis Kruskal - Wallis realizado en condiciones de disponibilidad de N (+N) para ambos días, reflejó que para el día 5 no existieron diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0.118$; Fig. 14, Tabla A2). Mientras que para el día 14, hubo diferencias significativas entre los tratamientos 1:1 y 1:2 y el tratamiento 1:0 (C+). De esta forma, 1:1 (C-) y 1:2 se diferenciaron de 1:0 (C+) pero no entre ellos ($p = 0.015$; Fig. 14, Tabla A2).

La abundancia de *R. raciborskii* sometida a condiciones deficientes de nitrógeno (-N) varió a lo largo del experimento (Fig. 14, Tabla A2). El tratamiento 1:2 presentó valores mayores de abundancia en comparación con el resto de los tratamientos para el Día 14, siendo un orden de magnitud más que al inicio del experimento (Fig. 14, Tabla A2). Mientras que el 1:0 (C+) y los tratamientos 1:5 y 1:10 mostraron una disminución con respecto al Día 5, obteniendo menor proporción de filamentos (Fig. 14, Tabla A2). El análisis Kruskal - Wallis y la prueba Dunn's realizada para ambos días (5 y 14) no reflejó diferencias significativas para el día 5 ($p = 0.106$). Sin embargo, reveló diferencias entre los tratamientos 1:2 y 1:10 para el día 14 ($p = 0.023$; Fig. 14, Tabla A2).

Los heterocitos presentes en algunos tratamientos fueron cónicos terminales, característicos de la especie, con filamentos que presentaron hasta dos heterocitos. El 52.2% de los filamentos analizados no presentaron heterocitos al inicio del experimento en condiciones +N (Fig. 15). Sin embargo, esta proporción cambió con el transcurso del tiempo y en función de los tratamientos. Al final del experimento, 1:0 (C+) presentó una proporción 98.3% y 1.7%, sin y con un heterocito por filamento, mientras que el resto de los tratamientos presentaron mayor presencia de 1 heterocito por filamento (Fig. 15).

El inicio del experimento en condiciones deficientes por nitrógeno (-N) comenzó con el 58.9% de los filamentos de *R. raciborskii* con 1 heterocito, mientras que el 16.7% de los filamentos presentaron 2 heterocitos (Fig. 15). Estas proporciones variaron con el transcurso de los días ya que se observó un aumento en la presencia de 1 heterocito por filamento (Fig. 15). Sin embargo, para el día 14 el 1:0 (C+) presentó un 61.7% de filamentos sin heterocitos mientras que el 38.7% restante 1 heterocito (Fig. 15). El largo promedio de dichas células especializadas fue de $7.33 \pm 0.66 \mu\text{m}$ para el experimento +N, mientras que para -N fue $6.51 \pm 0.56 \mu\text{m}$.

Los acinetes fueron ovalados e intercalados entre células vegetativas, presentando un largo y ancho promedio de $4.08 \pm 1.41 \mu\text{m}$ y $3.29 \pm 0.92 \mu\text{m}$, para el experimento +N y -N, respectivamente. Solamente se encontraron cuatro células de resistencia en 1:0 (C+), al finalizar el experimento en condiciones deficientes de nitrógeno.

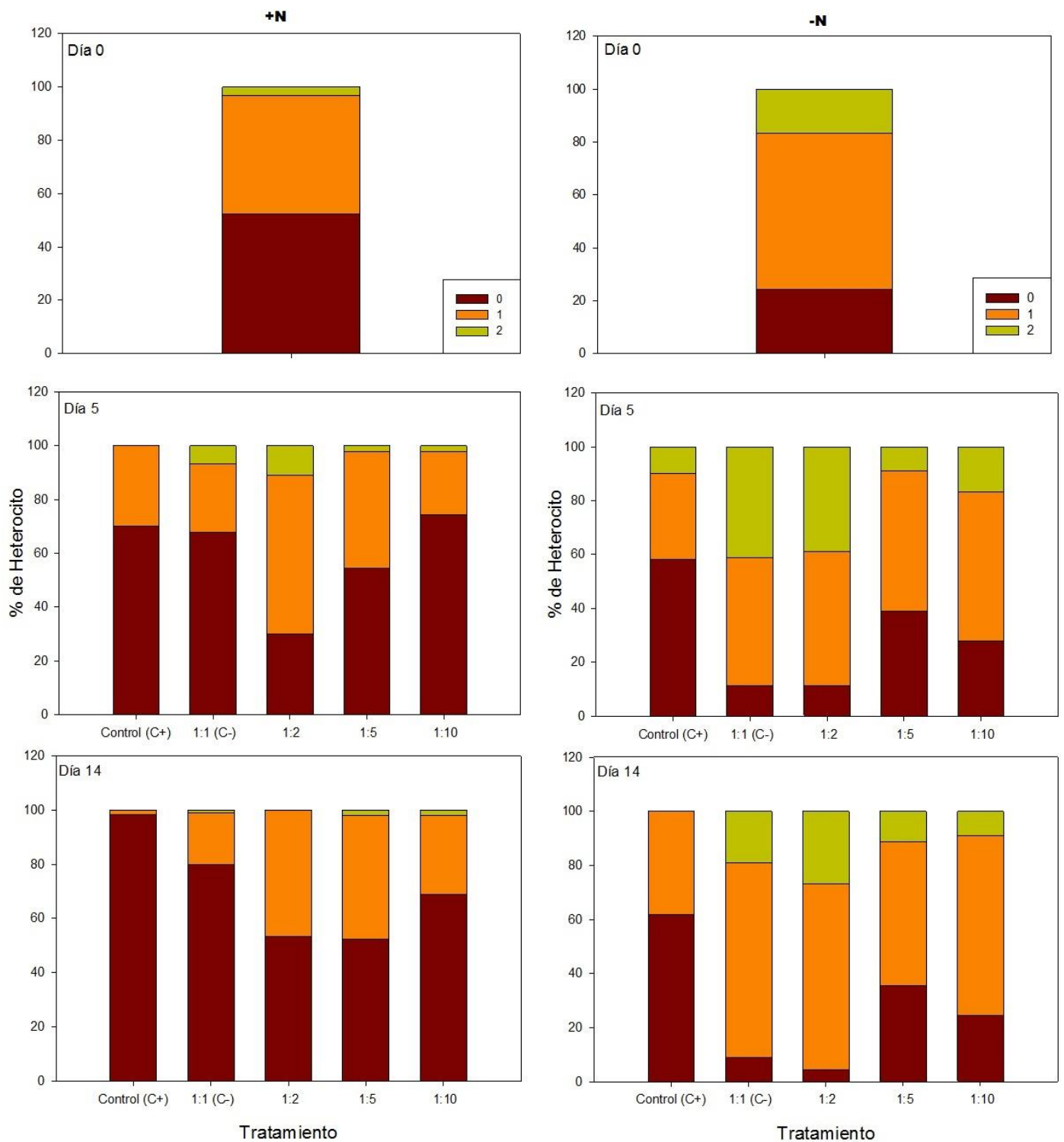


Figura 15. Proporción de heterocitos por filamento de *R. raciborskii* durante el transcurso del experimento para cada tratamiento sometido a condiciones óptimas de cultivo (panel izquierdo) y sin nitrógeno agregado (panel derecho) (n=3).

Discusión

Los resultados de esta tesis muestran el papel fundamental que tiene la disponibilidad de Fe en el crecimiento y morfología de *R. raciborskii*, tanto en condiciones óptimas de cultivo (con disponibilidad de N) como frente a la fijación de nitrógeno atmosférico (en ausencia de N inorgánico disuelto). Se pudo determinar que el Fe puede actuar como un nutriente estimulador del crecimiento y como un inhibidor a altas dosis. Este efecto del Fe fue más intenso cuando el cultivo se encontró estresado por otro nutriente como el N, el efecto de floculación se observó en las dosis altas y provocó una precipitación rápida de la biomasa. Asimismo, el crecimiento de *R. raciborskii* se mantuvo elevado hasta concentraciones de Fe siete veces superiores a las consideradas como óptimas (medio BG11) solo cuando el N estuvo disponible (+N). El Fe indujo cambios morfológicos significativos reflejados en mayor abundancia de filamentos más cortos cuando la concentración de Fe fue menor, mientras que a dosis mayores presentó menor cantidad de filamentos pero de largos mayores. Estos cambios fueron más notorios en condiciones de disponibilidad de nitrógeno. De esta forma, el Fe actuó como un micronutriente que promovió ambas modalidades de crecimiento (aumento de la abundancia de filamentos cortos y aumento del largo de los tricomas), con una tendencia a aumentar el largo de los filamentos y reducir su número en las condiciones de mayor estrés por la elevada concentración de Fe. Mientras que, frente a bajas concentraciones de Fe, la abundancia fue mayor pero los filamentos presentaron largos más reducidos. Por lo tanto, esta tesis muestra el efecto complejo que tiene el Fe en el crecimiento de una cianobacteria tóxica, filamentosa, fijadora de N₂, pudiendo actuar como estimulador e inhibidor del crecimiento. Estos resultados alertan sobre posibles efectos no deseados cuando se busca controlar una floración de cianobacterias mediante la aplicación de FeCl₃ en un cuerpo de agua, lo que podría producir una selección de organismos tolerantes al floculante, favorecer su dominancia y hasta estimular su crecimiento a largo plazo.

Influencia del Fe en el crecimiento con disponibilidad óptima de nutrientes

En condiciones óptimas, *R. raciborskii* exhibió tasas máximas de crecimiento en un amplio rango de concentraciones de cloruro férrico adicionado. El FeCl₃ no limitó el crecimiento de la cianobacteria sometida a concentraciones desde 32 a 160 $\mu\text{mol Fe L}^{-1}$ (tratamiento 1:1 (C-), 1:2 y 1:5 respectivamente). De hecho, y en comparación con 1:0 (C+) (tratamiento sin adición de Fe), la aplicación de Fe en dichas concentraciones benefició el crecimiento de la cianobacteria. Al igual que Fu et al. (2019), estos resultados sugieren que la presencia de nutrientes que incluyan la combinación de N y altas concentraciones de Fe son beneficiosas para el

crecimiento de *R. raciborskii*. Tanto en experimentos con condiciones controladas como a gran escala se ha evidenciado que el Fe podría ser un nutriente limitante para el desarrollo de cianobacterias (Chow et al., 1998; Twiss et al., 2000; Downs et al., 2008; Larson et al., 2015; Larson et al., 2018). Sin embargo, este trabajo refleja una gran tolerancia de *R. raciborskii* al gradiente de Fe aplicado y el efecto inhibitorio frente a concentraciones de Fe extremadamente altas. El tratamiento 1:10, cuya concentración fue de 320 $\mu\text{mol Fe L}^{-1}$, restringió el crecimiento al punto de desencadenar la floculación y sedimentación de los filamentos que se encontraban en suspensión. Si bien estas observaciones no son apoyadas completamente por los análisis estadísticos, los resultados del biovolumen y tasas de crecimiento sí las corroboran.

Las concentraciones de fósforo reactivo soluble (PRS) observadas en este experimento fueron similares entre sí, aunque significativamente mayores en 1:5 en relación a 1:1 (C-). Si bien ambos tratamientos presentaron un aumento en la biomasa, 1:5 presentó mayor concentración de PRS mientras que ésta fue menor en 1:1 (C-). Podría esperarse que a mayor crecimiento, mayor consumo de fósforo disponible, sin embargo se observó lo contrario indicando que el P no fue limitante luego de la fase exponencial. A pesar de dichas observaciones, estos resultados podrían no estar asociados con la biomasa de *R. raciborskii* desarrollada sino con las concentraciones de FeCl_3 adicionadas. Diferentes investigaciones sugieren que la adición de FeCl_3 a cuerpos de agua podría disminuir las concentraciones de P total y P disponible (Boers et al., 1992; Gächter & Müller, 2003; Katsev et al., 2006). De esta forma se esperaría observar una caída progresiva de las concentraciones de PRS al aumentar las dosis de FeCl_3 . Dicha disminución sólo se observó en el tratamiento 1:1 (C-), cuya concentración de PRS fue la más baja. La alta concentración de PRS observada en el tratamiento 1:5 se debe posiblemente al método utilizado (método de azul de molibdeno) ya que sobreestima la concentración de fósforo disponible al liberar el fósforo retenido por FeCl_3 . La cuota de P más baja se presentó en uno de los tratamientos donde se observó mayor crecimiento (1:2), lo cual podría estar reflejando la utilización de reservas celulares de P para sostener el crecimiento exponencial (Isvánovics et al., 2000; Reynolds, 2006; Ind et al., 2009). Respecto a la cuota celular de P obtenida al final del tratamiento 1:10, la cuota elevada podría deberse a la presencia del flóculo de Fe con el P y los organismos en las muestras cuando se homogeneizó cada réplica. Según Zhang et al. (2017) altas concentraciones de FeCl_3 podrían ser tóxicas para las cianobacterias, lo que llevaría a la autólisis de las mismas y una sobrestimación de la cuota celular de P.

La respuesta positiva del crecimiento de *R. raciborskii* al amplio gradiente de Fe aplicado, muestra que el principal efecto en condiciones de disponibilidad de nutrientes (N y P) fue de neutro a estimulador del crecimiento. Solo se obtuvo inhibición en concentraciones de Fe extremas. Estos resultados cuestionan el uso de FeCl_3 como herramienta de mitigación de

floraciones de cianobacterias en cuerpos de agua eutróficos con concentraciones elevadas de N, como los de nuestro país (Rodríguez-Gallego, 2011; Bonilla et al., 2015; Aubriot et al., 2017; Haakonsson et al., 2017). Es evidente la necesidad de estudios detallados sobre dosificación óptima para cada caso de aplicación, teniendo en cuenta las concentraciones fluctuantes de nutrientes en el cuerpo de agua.

Influencia del Fe en el crecimiento bajo fijación de N atmosférico

La inhibición de crecimiento de *R. raciborskii* frente a la deficiencia de nitrógeno reflejada en el tratamiento 1:5 podría deberse al papel crucial de la fijación de nitrógeno, limitando el crecimiento debido a que esta actividad requiere un gran gasto energético (Stam, 1987; Burford et al., 2017). Molot et al. (2017) sugieren que *R. raciborskii* es capaz de reducir su crecimiento y desviar energía hacia la fijación de N₂ frente a la falta de nitrógeno disponible. Sin embargo, varios estudios en cultivos controlados, han demostrado que la deficiencia por nitrógeno resulta en cambios modestos en las tasas de crecimiento (Allen & Arnon 1955; Schlangstedt, 1987; Bagchi et al., 1985; Vargas et al., 1998). El resto de los tratamientos presentaron un comportamiento similar al observado en el experimento bajo condiciones óptimas de cultivo.

Respecto a los nutrientes, el PRS presentó altas concentraciones en tratamientos donde se observó crecimiento de *R. raciborskii* y menores concentraciones donde se inhibió. Reflejando un mayor consumo de fósforo disponible en tratamientos donde el crecimiento fue inhibido, lo cual podría deberse a la capacidad de esta especie por almacenar fosfato (Isvánovics et al., 2000) como respuesta al estrés causado por las altas concentraciones de Fe y necesidad de fijar N₂. Bibliografía consultada sugiere que la fijación de nitrógeno requiere una mayor disponibilidad de fósforo (Stewart & Alexander, 1971; Kenesi et al., 2009) lo que se vincula con mayores demandas de energía (Simpson & Burris, 1984) y/o mayor síntesis de enzimas que contienen fósforo en el heterocito (Wolk et al., 1994). Sin embargo, la concentración de fósforo disuelto fue mayor en condiciones de fijación de N, probablemente debido a la limitación por nitrógeno y la menor absorción de fosfato (Yema et al., 2016). Las cuotas celulares de P tuvieron su pico máximo en 1:0 (C+), lo cual podría deberse a que éste presentó un aumento de biomasa durante los primeros días y decayó de manera abrupta al finalizar el experimento, a diferencia de 1:5 y 1:10 cuyo crecimiento fue inhibido desde el inicio. La cuota celular de N observada, y en concordancia con lo discutido para la cuota de P, presentó su mayor valor también en 1:0 (C+), posiblemente porque al inicio aumentó su biomasa (y por ende fijó nitrógeno atmosférico), sin embargo, decayó con el tiempo.

Este ensayo en condiciones estresantes por N y una aparente mayor demanda de P para la fijación de N atmosférico, mostró que *R. raciborskii* fue más sensible al gradiente de Fe aplicado. En consecuencia, estos resultados muestran un escenario de mayor complejidad para predecir el efecto de aplicaciones de cloruro férrico en floraciones de cianobacterias, ya que las condiciones nutricionales estresantes podrían potenciar el efecto de las aplicaciones de Fe. Este resultado puede servir como guía para definir la aplicación de Fe en un período de tiempo específico en el cual se pueda detectar estrés de las cianobacterias dominantes por N o P, para lograr un mejor resultado del control de su crecimiento.

Flexibilidad morfológica

R. raciborskii presentó filamentos rectos, en ambos experimentos y para todos los tratamientos, como los observados en diferentes poblaciones de la especie en la región, y en particular en la cepa MVCC19 (Vidal & Kruk, 2008; Fabre, 2011; Martigani, 2012). Los cambios observados en la morfología se asociaron al tamaño de los tricomas (en particular al largo) y el desarrollo de heterocitos, tal como fue observado en otros estudios (Yema et al., 2016; Burford et al., 2017).

En condiciones óptimas de nutrientes, filamentos más largos se asociaron a dosis altas de FeCl_3 (tratamientos 1:5 y 1:10). Este aumento en el largo no tuvo correspondencia con las tasas de crecimiento, ya que la tasa de crecimiento del tratamiento 1:5 fue positiva, mientras que en 1:10 se produjo inhibición. Esto podría deberse a que los filamentos de *R. raciborskii* no fueron sometidos a una limitación por N_2 , y por ende *R. raciborskii* presentó tasas de crecimiento positivas en todos los tratamientos menos 1:10 (donde se observó floculación). Sin embargo, la abundancia observada en el experimento +N reflejó una relación inversa con el largo promedio de los mismos. De este modo, la estrategia de crecimiento de *R. raciborskii* bajo estas condiciones experimentales fue hacia un aumento en el largo ó hacia un aumento en la cantidad de filamentos. El tipo de estrategia podría estar ligado a la concentración de FeCl_3 adicionada: a bajas concentraciones de Fe se observaron muchos filamentos cortos (predominando la estrategia de crecimiento por división), mientras que a altas dosis de Fe los filamentos presentaron largos mayores, lo que podría deberse a una estrategia de sobrevivencia de *R. raciborskii* ante el estrés provocado por la elevada concentración de FeCl_3 . La ecuación de Padisak et al. (2003) permite calcular el factor de resistencia de forma (definido como un número adimensional que expresa cuánto más lento o más rápido se hunde una partícula en contraste con una esfera de volumen equivalente) $\phi = 0.0503x + 1.1355$, donde $x = L/D$ (siendo L el largo y D el diámetro del filamento). En el caso del tratamiento 1:10 ϕ tiene un valor de 5,568, lo cual indicaría una buena resistencia al hundimiento para los filamentos de

éste tratamiento (Padisak et al., 2003; Reynolds, 2006). De esta forma, organismos más largos podrían resistir la sedimentación, mecanismo que permitiría mantenerse en la columna de agua y disponer de nutrientes y luz (Padisak et al., 2003). Es importante destacar que ambas estrategias estuvieron presentes en simultáneo en el tratamiento 1:5, ya que presentó un aumento en el largo y en la cantidad de filamentos.

Frente a la necesidad de fijar N atmosférico, los organismos tuvieron como respuesta la disminución del largo de los filamentos respecto al tamaño inicial durante el transcurso del experimento. Esto podría deberse a que el proceso de fijación de N atmosférico requiere un gasto de energía extra que llevaría a la disminución en el largo del filamento de manera general o a que la cantidad de N₂ fijada por los heterocitos no sería la suficiente para sostener tricomas largos con varias células (Stam, 1987; Burford et al., 2017; Molot et al., 2017). Diferentes autores han evidenciado variaciones en el largo de filamentos de *R. raciborskii* en función de la disponibilidad de nitrógeno (Kenesi et al., 2009; Sarthou, 2016; Yema et al., 2016). De esta forma, bajo condiciones de fijación de N atmosférico, existiría una restricción en el largo del filamento en comparación con condiciones de suficiencia por N₂, seguramente debido a que es posible nutrir pocas células con el nitrógeno fijado a partir de dos heterocitos terminales (Yema et al., 2016).

La relación entre la abundancia y el largo de los filamentos en el experimento -N fue similar al experimento +N, ya que el tratamiento 1:2 presentó mayor cantidad de filamentos pero estos fueron más cortos, mientras que en los tratamientos 1:5 y 1:10 (donde el crecimiento fue inhibido) los filamentos exhibieron largos mayores. En un escenario de fijación de N₂, donde se da un aumento en la cantidad de filamentos combinado con largos menores podría reflejar que la población está en crecimiento, lo cual se ve apoyado con el aumento en la tasa de crecimiento del tratamiento 1:2 a lo largo del experimento. Sin embargo, en un mismo contexto de fijación de N₂ pero con altas dosis de FeCl₃, los organismos tienden a ser más largos y dividirse menos, lo que explicaría las bajas (e incluso negativas) tasas de crecimiento. Como consecuencia de las altas concentraciones de FeCl₃ los organismos tienden a aumentar su largo para contrarrestar la sedimentación (tal como se vio en el experimento +N), lo que provocaría una dificultad en la difusión de N fijado en los heterocitos terminales a lo largo del filamento. Esta respuesta de aumentar el largo de los filamentos frente a las altas concentraciones de Fe adicionadas posiblemente para contrarrestar la sedimentación expone dos importantes interpretaciones, por un lado, el papel clave que tiene el Fe en la fijación de N₂ ya que permitiría que los organismos mantengan su tamaño (Boyd & Abraham, 2001; Shi et al., 2012). Por otro lado, podría ser una respuesta de adaptación al estrés de *R. raciborskii* al aumentar el largo de los filamentos, y no su cantidad, cuando el crecimiento celular se ve

limitado por las condiciones de alto Fe y bajo N disponible. Es necesario profundizar en dichas respuestas morfológicas en futuras investigaciones para dilucidar si los cambios morfológicos de *R. raciborskii* le confieren ventajas adaptativas para sobrellevar condiciones desfavorables y poder desarrollarse cuando las condiciones ambientales mejoran.

Los heterocitos son células diferenciadas cuya función radica en fijar nitrógeno atmosférico gracias al complejo enzimático nitrogenasa (Wolk et al., 1994; Wolk, 2000; Meeks & Elhai, 2002; Golden & Yoon, 2003). Teniendo en cuenta que las cianobacterias requieren más N que otros nutrientes (Molot et al., 2014), la aparición de estas células especializadas está relacionada con la disponibilidad de éste nutriente en el medio, ya que su desarrollo aumenta en condiciones deficientes de N (Branco & Senna, 1994; Padisák, 1997; Bouvy et al., 2000; Everson et al., 2011). Debido a estas funciones, era esperable observar heterocitos en el experimento -N. Sin embargo y al igual que en el experimento +N, la presencia de uno o más heterocitos por filamento podría estar relacionado con la disponibilidad de Fe. Esta observación se debe a que el 1:0 (C+) del experimento -N presentó filamentos con un heterocito, mientras que el resto de los tratamientos exhibieron tanto uno como dos por filamento. Situación similar se observó en el experimento +N, donde el 1:0 (C+) no presentó heterocitos por filamento pero sí lo hicieron el resto de los tratamientos. De esta forma, la no disponibilidad de Fe podría estar limitando la formación de estas células especializadas.

Las estructuras de resistencia o acinetes se observaron solo al finalizar el experimento -N en el tratamiento 1:0 (C+), destacando así la importancia del Fe para estos organismos, ya que la ausencia del mismo pudo haber generado que *R. raciborskii* desarrollara este tipo de células. Este efecto estimulador sobre la formación de células de resistencia expone una nueva controversia sobre el uso de FeCl₃ como control del crecimiento de cianobacterias con esta capacidad, debido al posible reclutamiento de las poblaciones cuando las condiciones en el cuerpo de agua mejoran.

Conclusiones

Este trabajo presenta resultados novedosos sobre la relación entre la aplicación de diferentes concentraciones de Fe y las tasas de crecimiento, cuotas celulares de nutrientes y morfología de *R. raciborskii* bajo condiciones controladas.

En esta investigación se pudo observar el efecto conocido del Fe como método para combatir el crecimiento algal en lagos con alta disponibilidad de nutrientes (Walker et al., 1989; Engstrom, 2005; Wolter, 2010; Orihel et al., 2016). Este efecto se observó en la adición de concentraciones muy elevadas ($320 \mu\text{molFeL}^{-1}$, tratamiento 1:10) para ambos experimentos, con y sin nitrógeno disponible. Sin embargo, se pudo determinar que el Fe actúa como un estimulador del crecimiento de *R. raciborskii* dentro de rangos de concentración incluso mayores a los considerados como óptimos (medio BG11), lo que indica que el Fe puede tener un efecto positivo sobre la biomasa de cianobacterias (Wurtsbaugh & horne 1983; Twiss et al., 2000; Downs et al., 2008), sobre todo con buena disponibilidad de N inorgánico disuelto. El doble papel que presenta el Fe como inhibidor y promotor de crecimiento plantea un escenario complejo sobre el efecto de aplicaciones de Fe en lagos con floraciones de esta cianobacteria, lo que muestra la necesidad de encontrar la dosis óptima para su uso como medida de mitigación. Este trabajo evidencia la necesidad de contar con información histórica detallada de las variables fisicoquímicas (entre ellas los nutrientes) y de la comunidad de fitoplancton del lago, a la hora de aplicar este tipo de herramientas de mitigación.

Diferentes estudios sugieren que la disminución del N no tiene gran impacto en las tasas de crecimiento y biomasa de algunas cianobacterias en estudios bajo condiciones controladas (Allen & Arnon 1955; Bagchi et al., 1985; Schlangstedt 1987; Vargas et al., 1998; Molot et al., 2017). Sin embargo, la ausencia de nitrógeno disuelto disponible y por ende la necesidad de fijación de nitrógeno atmosférico tuvieron un efecto en el crecimiento de *R. raciborskii* frente a la adición de $160 \mu\text{molFeL}^{-1}$ (tratamiento 1:5), ya que a igual concentración, los experimentos presentaron resultados opuestos.

Tanto el fósforo como el nitrógeno son considerados nutrientes claves que limitan la producción primaria y biomasa algal (Schindler, 1977; Schindler et al., 2008; Conley et al., 2009; Liu et al., 2011; Dolman et al., 2012). Sin embargo, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes, accesibilidad a luz y en temperaturas adecuadas, el hierro podría ser el desencadenante de una floración (Rydin et al., 2002; Gonzalez et al., 2018), en particular de cianobacterias fijadoras de N atmosférico (Rydin et al., 2002). Esto se debería al papel central que presenta en

las redes metabólicas, controlando la distribución de electrones en el complejo fotosintético y la cadena respiratoria (Rodhe, 1948; Gerloff & Skoog, 1957; Schelske, 1962).

La cianobacteria planctónica *Raphidiopsis raciborskii* puede adaptarse a diferentes condiciones ambientales, lo que le otorga una ventaja competitiva frente a otras especies de fitoplancton y así generar elevadas biomásas en ecosistemas limitados por nutrientes y/o con aportes fluctuantes (Briand et al., 2004; Fabre, 2011; Bonilla et al., 2012; Amaral et al., 2014; Galvanese et al., 2019). Teniendo en cuenta el aumento en la ocurrencia de floraciones y la capacidad de *R. raciborskii* de adaptación a diferentes ambientes con un comportamiento poco predecible, la comprensión del funcionamiento de los ambientes acuáticos requiere profundizar en el conocimiento ecofisiológico de especies clave y mejorar la comprensión de los mecanismos detrás de las floraciones de esta cianobacteria. Los resultados que aquí se muestran son novedosos ya que el estudio de las condiciones que estimulan el crecimiento de cianobacterias y sus implicancias para mitigarlas son foco de debate en la comunidad científica.

Este trabajo se llevó a cabo bajo condiciones controladas donde se excluyeron factores que intervienen en el control de cianobacterias, por ejemplo, variaciones en temperatura y disponibilidad de luz, herbivoría, entre otros. Por lo tanto, sería necesario continuar con investigaciones que contemplen estos factores, así como diferentes escalas, que permitan extrapolar estos resultados a lo que ocurre en los ecosistemas acuáticos. A su vez, sería importante continuar evaluando el efecto del Fe ya que, si bien se observó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *R. raciborskii*, se pudo comprobar su efecto potenciador en el crecimiento.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi gran compañero Mathias por su amor, paciencia y apoyo incondicional que me motivaron siempre a cumplir mis objetivos. Y a Sebastián por darme el impulso final que necesitaba.

A mis padres, Adriana y José, y hermano Gastón, por su constante motivación, cariño y buenas energías ante cada etapa.

Le agradezco especialmente a mi tutor, Luis, por la gran oportunidad de fortalecer mi formación académica, por la paciencia y el tiempo dedicado durante toda la pasantía. Y también a mi co-tutora, Andrea, por sus ideas, buena disposición, interés y apoyo brindado.

A la familia de Mathias, por alentarme y hacerme sentir querida siempre.

A todos y cada uno de mis amigos que tuve la suerte de conocer durante estos años y con los que compartí horas de estudio, trabajos, nervios y risas.

Finalmente, agradezco a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la financiación, dentro del Proyecto Alianzas por la Innovación Proyecto ALI_1_2017_1_137101. Y a la Sección de Limnología por haber hecho posible la realización de esta tesis.

Gracias!

Anexo A

Tabla A1. Valor medio y desvío estándar del Volumen de organismos por tratamiento para ambos experimentos en los días 5 y 14. Día 0 resultó en un solo valor por experimento ($1242.35 \pm 510.29 \mu\text{m}^3$ +N) y ($846.08 \pm 336.65 \mu\text{m}^3$ -N).

| | Día 5 | | Día 14 | |
|----------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | +N | -N | +N | -N |
| 1:0 (C+) | 670.25 ± 208.12 | 857.62 ± 300.69 | 389.84 ± 126.56 | 331.54 ± 123.80 |
| 1:1 (C-) | 763.87 ± 296.22 | 778.14 ± 225.60 | 493.19 ± 152.85 | 637.87 ± 170.80 |
| 1:2 | 788.64 ± 304.84 | 688.94 ± 153.22 | 673.32 ± 191.15 | 549.85 ± 164.09 |
| 1:5 | 898.57 ± 337.38 | 770.54 ± 220.94 | 917.53 ± 328.42 | 714.02 ± 248.60 |
| 1:10 | 1063.21 ± 454.58 | 708.79 ± 203.67 | 108.06 ± 508.90 | 694.38 ± 242.95 |

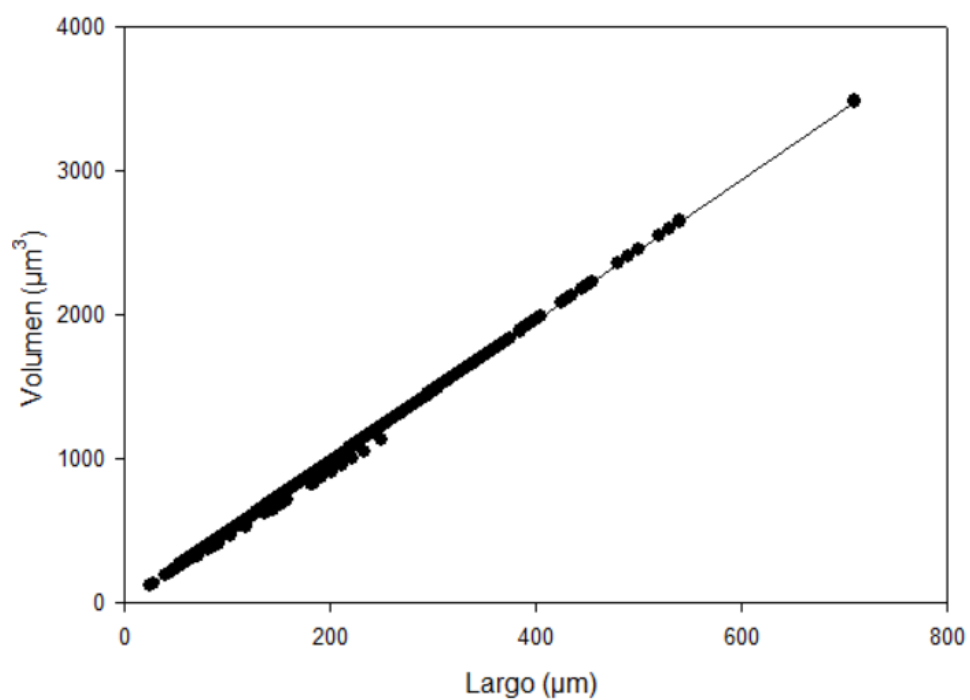


Figura A1. Relación entre volumen y largo de organismos en condiciones óptimas de cultivo (+N), cuyo valor de r^2 fue 0.9993863496

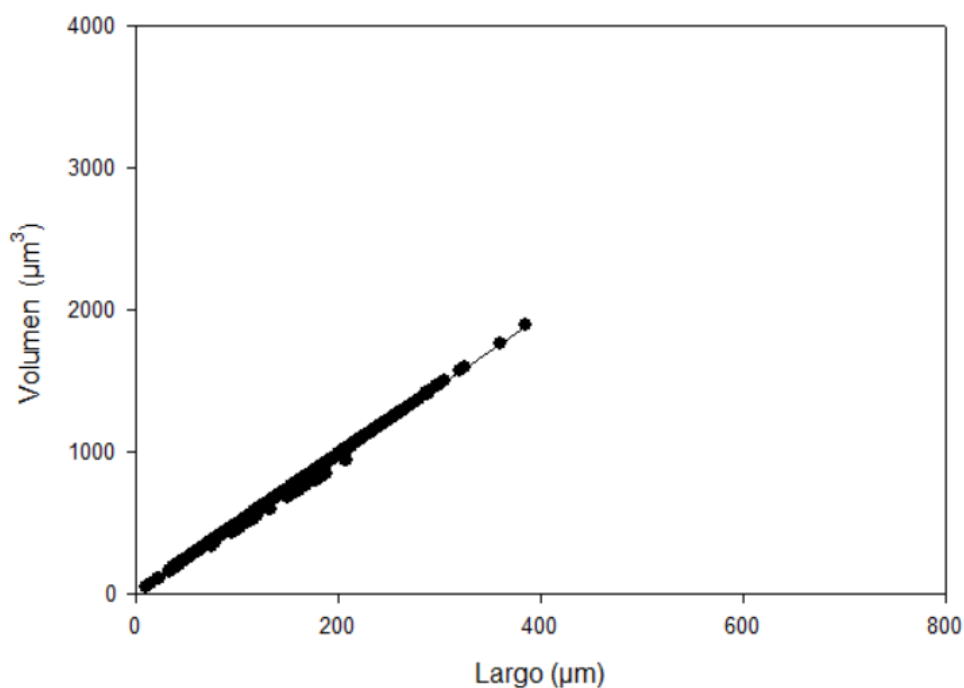


Figura A2. Relación entre volumen y largo de organismos en condiciones deficientes de nitrógeno (-N), cuyo valor de r^2 fue 0.9986011416

Tabla A2. Valor medio y desvío estándar de la Abundancia (org/ml) y Largo promedio (μm) de organismos por tratamiento para ambos experimentos en los días 5 y 14.

| | +N | | | | -N | | | |
|----------|--------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| | Día 5 | | Día 14 | | Día 5 | | Día 14 | |
| | Abundancia (org/ml) | Largo promedio (μm) | Abundancia (org/ml) | Largo promedio (μm) | Abundancia (org/ml) | Largo promedio (μm) | Abundancia (org/ml) | Largo promedio (μm) |
| 1:0 (C+) | 174500.00 \pm 63500.00 | 136.54 \pm 26.04 | 486250.00 \pm 48750.00 | 79.42 \pm 1.25 | 233000.00 \pm 17000.00 | 174.71 \pm 2.91 | 147678.5 \pm 15178.57 | 67.54 \pm 1.00 |
| 1:1 (C-) | 73884.62 \pm 33115.38 | 159.43 \pm 17.07 | 2110500.00 \pm 505500.00 | 100.47 \pm 18.17 | 272666.67 \pm 62043.00 | 158.52 \pm 10.71 | 432000.00 \pm 12000.00 | 133.54 \pm 3.98 |
| 1:2 | 69208.33 \pm 23624.04 | 160.66 \pm 14.28 | 2192000.00 \pm 431407.00 | 137.17 \pm 9.30 | 270000.00 \pm 42000.00 | 140.35 \pm 11.25 | 1460000.00 \pm 99554.56 | 112.01 \pm 4.11 |
| 1:5 | 48550.00 \pm 2950.00 | 183.06 \pm 29.01 | 432800.00 \pm 55200.00 | 186.92 \pm 33.51 | 249800.00 \pm 47800.00 | 156.97 \pm 4.08 | 163879.63 \pm 30481.73 | 145.46 \pm 13.25 |
| 1:10 | 54584.25 \pm 20807.65 | 216.59 \pm 13.13 | 63433.33 \pm 1209.68 | 220.03 \pm 11.80 | 171885.71 \pm 23314.29 | 144.71 \pm 11.93 | 138017.86 \pm 15732.14 | 141.46 \pm 8.23 |

Bibliografía

- Aguilera, A., Berrendero, E., Kaštovský, J., Echenique, R. & Salerno, G. (2018). The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Phycologia*, 57, 130-146. <https://doi.org/10.2216/17-2.1>
- Allen, M.B. & Arnon, D.I. (1955). Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* lemm. *Plant Physiol.* 30, 366-372. <https://doi.org/10.1104/pp.30.4.366>
- 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(1), 134–141. <https://doi.org/10.1080/09670262.2014.897760>
- Arrigo, K. (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, 437, 349-355. <https://doi.org/10.1038/nature04159>
- Aubriot, L., Delbene, L., Haakonsson, S., Somma, A., Hirsch, F., & Bonilla, S. (2017). Evolución de la eutrofización en el Río Santa Lucía: Influencia de la intensificación productiva y perspectivas. *INNOTEC*, 14 jul-dic, 07–16. <https://doi.org/10.26461/14.04>
- Aubriot, L., Zabaleta, B., Bordet, F., Sienna, D., Risso J., Achkar M., & Somma, A. (2020). Assessing the origin of a massive cyanobacterial bloom in the Río de la Plata (2019): Towards an early warning system. *Water Research*. WR54528. Aceptado.
- Auer, M. T., Kieser, M. S., & Canale, R. P. (1986). Identification of critical nutrient levels through field verification of models for phosphorus and phytoplankton growth. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43(2), 379–388. <https://doi.org/10.1139/f86-048>
- Bagchi, S.N., Sharma, R. & Singh, H.N. (1985). Inorganic nitrogen control of growth, chlorophyll, and protein level in cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *J. Plant Physiol.* 121, 73- 81. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(85\)80092-4](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80092-4)
- Boers, P., Van der Does, J., Quaak, M., Van der Vlugt, J., & Walker, P. (1992). Fixation of phosphorus in lake sediments using iron(III)chloride: Experiences, expectations. In L. Van Liere & R. D. Gulati (Eds.), *Restoration and Recovery of Shallow Eutrophic Lake Ecosystems in The Netherlands*, 211–212. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2432-4_19
- Bonilla, S., & Conde, D. (2000). El fitoplancton como descriptor sensible de cambios ambientales en las lagunas costeras de la Reserva Bañados del Este. *PROBIDES/GEF*, 31, 63–73.
- Bonilla, S. (2009). *Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión: Documento Técnico PHI*, 16.
- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M. C. S., González-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V. L. M., Lürling, M., Antoniades, D., Padišák, J., & Kruk, C. (2012). What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiology Ecology*, 79(3), 594–607. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01242.x>
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., León, L. D., Brena, B., Pérez, M., Piccini, C., Escalera, G. M. de la, Chalar, G., González-Piana, M., Martigani, F., & Aubriot, L. (2015). Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *INNOTEC*, 10 ene-dic, 9–22.
- Bonilla, S., Aubriot, L., Haakonsson, S., Illarze, M., Díaz, I. & Brena, B. (2021). Las floraciones de cianobacterias tóxicas comprometen el uso del agua del Río Negro, Uruguay. *INNOTEC*
- Bouvy, M., Falcão, D., Marinho, M., Pagano, M. & Moura, A. (2000). Occurrence of *Cylindrospermopsis* (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. *Aquatic Microbial Ecology* 23, 13-27.

- Boyd, P. W., & Abraham, E. R. (2001). Iron-mediated changes in phytoplankton photosynthetic competence during SOIREE. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 48, 11–12, 2529–2550. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(01\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(01)00007-8)
- Branco, C. W. & Senna, P. A. (1994). Factors influencing the development of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Microcystis aeruginosa* in the Paranoá Reservoir, Brasília, Brazil. *Algological Studies*, 85-96.
- Briand, J.-F., Leboulanger, C., Humbert, J.-F., Bernard, C., & Dufour, P. (2004). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: Selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology*, 40, 231–238. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03118.x>
- Burford, M. A., & O'donohue, M. J. (2006). A comparison of phytoplankton community assemblages in artificially and naturally mixed subtropical water reservoirs. *Freshwater Biology*, 51(5), 973–982. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2006.01536.x>
- Burford, M.A., Willis, A., Chuang, A., Man, X. & Orr, P.T. (2018). Recent insights into physiological responses to nutrients by the cylindrospermopsin producing cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Ocean. Limnol.* 36, 1032–1039.
- Carpenter, S., & Cottingham, K. (1997). Resilience and Restoration of Lakes. *Conservation Ecology*, 1(1). <https://doi.org/10.5751/ES-00020-010102>
- Chonudomkul, D., Yongmanitchai, W., Theeragool, G., Kawachi, M., Kasai, F., Kaya, K., & Watanabe, M. M. (2004). Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(3), 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.02.014>
- Chorus, I., & Bartram, J. (1999). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. World Health Organization.
- Chorus, I., & Welker, M. (2021). Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003081449>
- Chow, C. W. K., House, J., Velzeboer, R. M. A., Drikas, M., Burch, M. D., & Steffensen, D. A. (1998). The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells. *Water Research*, 32(3), 808–814. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00276-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00276-5)
- Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Havens, K. E., Lancelot, C., & Likens, G. E. (2009). Ecology. Controlling eutrophication: Nitrogen and phosphorus. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5917), 1014–1015. <https://doi.org/10.1126/science.1167755>.
- Cremella, B., Huot, Y. y Bonilla, S., (2018). Interpretation of total phytoplankton and cyanobacteria fluorescence from cross-calibrated fluorometers, including sensitivity to turbidity and colored dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography: Methods*, 16(12), 881 – 894. <https://doi.org/10.1002/lom3.10290>
- Dolbeth, M., Pardal, M., Lillebø, A. I., Azeiteiro, U., & Marques, J. (2003). Short- and long-term effects of eutrophication on the secondary production of an intertidal macrobenthic community. *Marine Biology*, 143, 1229–1238. <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1133-5>
- Dolman, A. M., Rucker, 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038757>
- Downing, J. A., & McCauley, E. (1992). The nitrogen: Phosphorus relationship in lakes. *Limnology and Oceanography*, 37(5), 936–945. <https://doi.org/10.4319/lo.1992.37.5.0936>
- Downs, T. M., Schallenberg M., & Burns, C. W. (2008). Responses of lake phytoplankton to micronutrient enrichment: a study in two New Zealand lakes and an analysis of published data. *Aquatic Sciences* 70, 347–360.

- Engstrom, D. R. (2005). Long-term Changes in Iron and Phosphorus Sedimentation in Vadnais Lake, Minnesota, Resulting from Ferric Chloride Addition and Hypolimnetic Aeration. *Lake and Reservoir Management*, 21(1), 95–105. <https://doi.org/10.1080/07438140509354417>
- Everson, S., Fabbro, L., Kinnear, S., & Wright, P. (2011). Extreme differences in akinete, heterocyte and cylindrospermopsin concentrations with depth in a successive bloom involving *Aphanizomenon ovalisporum* and *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju. *Harmful Algae* 10(3), 265-276.
- Fabre, A., Carballo, C., Piriz, P., González, S., Aubriot, L., Bonilla, S., Kruk, C., Hernández, E., Bergamino, L., Mello, L., Pérez, G., & León, J. G. (2010). Nitrogen and euphotic/mixing zone ratio explain cyanobacterial occurrence in small subtropical man-made lakes (Uruguay). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 5(1), 112–125.
- Fabre, A. (2011). Flexibilidad fenotípica de la cianobacteria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* en un gradiente lumínico. Universidad de la República (Uruguay) - Facultad de Ciencias.
- Fontúrbel Rada, F. (2016). Indicadores fisicoquímicos y biológicos del proceso de eutrofización del lago Titikaka (Bolivia). *Ecología Aplicada*, 4(1–2), 135. <https://doi.org/10.21704/rea.v4i1-2.308>
- Fu, Q.b-L., Yeung, A. C. Y., Fujii, M., Neilan, B. A. & Waite, T. D. (2019), Physiological responses of the freshwater N2-fixing cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* to Fe and N availabilities. *Environ Microbiol*, 21, 1211-1223.
- Gächter, R., & Müller, B. (2003). Why the phosphorus retention of lakes does not necessarily depend on the oxygen supply to their sediment surface. *Limnology and Oceanography*, 48, 929–933. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.2.0929>
- Galvanese, E.F., Padial, A.A., & Aubriot, L. (2019). Acclimation at high temperatures increases the ability of *Raphidiopsis raciborskii* (Cyanobacteria) to withstand phosphate deficiency and reveals distinct strain responses. *European Journal of Phycology*, 54(3), 359–368. <https://doi.org/10.1080/09670262.2019.1567824>
- Gerloff, G., & Skoog, F. (1957). Availability of Iron and manganese in southern Wisconsin lakes for the growth of *Microcystis aeruginosa*. *Ecology*, 38, 551. <https://doi.org/10.2307/1943118>
- Golden, J.W. & Yoon, H.S. (2003). Heterocyst development in *Anabaena*. *Curr Opin Microbiol* 6, 557– 563.
- González, A., Fillat, M. F. , Bes, M., María-Luisa Peleato, M., & Sevilla, E. (2018). The Challenge of Iron Stress in Cyanobacteria. In (Ed.), *Cyanobacteria*. IntechOpen.
- González-Madina, L., Levrini, P., de Tezanos Pinto, P., Burwood, M., Crisci, C., Cardozo, A., Lagomarsino, J. J., Pacheco, J. P., Fosalba, C., Méndez, G., Garrido, L. & Mazzeo, N. (2022). Blooms of toxic *Raphidiopsis raciborskii* in Laguna del Sauce (Uruguay): environmental drivers and impacts. *Hydrobiologia* 849, 4041–4058.
- Goyenola, G., Kruk, C., Mazzeo, N., Nario, A., Perdomo, C., Piccini, C., & Meerhoff, M. (2021). Producción, nutrientes, eutrofización y cianobacterias en Uruguay: armando el rompecabezas. *INNOTEC*, (22 jul-dic), e558. <https://doi.org/10.26461/22.02>
- Haakonsson, S., Rodríguez-Gallego, L., Somma, A. & Bonilla, S. (2017). Temperature and precipitation shape the distribution of harmful cyanobacteria in subtropical lotic and lentic ecosystems. *Science of The Total Environment*, 609, 1132-1139, ISSN 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.067>
- Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Røberg, K., Skulberg, R., Beck, M., & Wiedner, C. (2008). Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae*, 7(5), 692–701. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.02.010>
- Heisler, J., Glibert, P., Burkholder, J., Anderson, D., Cochlan, W., Dennison, W., Gobler, C., Dortch, Q., Heil, C., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H., Sellner, K., Stockwell, D., Stoecker, D., & Suddleson, M. (2008). Eutrophication and Harmful Algal Blooms: A Scientific Consensus. *Harmful Algae*, 8(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.006>

- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35(2), 403–424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>
- Howarth, R., Billen, G., Swaney, D., Townsend, A., NA, J., Lajtha, K., Downing, J., Elmgren, R., Caraco, N., Jordan, T., Berendse, F., Freney, J., Kudryarov, V., Murdoch, P., & Zhao-Liang, Z. (1996). Regional Nitrogen budgets and riverine N & P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean: natural and human influences. *Biogeochemistry*, 35, 75 – 139. <https://doi.org/10.1007/BF02179825>
- Hötzel, G., & Croome, R. (1999). A phytoplankton methods manual for Australian freshwaters.
- Ind, A., Burford, M., & Shaw, G. (2009). Pulses of Phosphate promote dominance of the toxic cyanophyte *Cylindrospermopsis raciborskii* in a subtropical water reservoir. *Journal of Phycology*, 45. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00675.x>
- 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(2), 257 – 275. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2000.00549.x>
- Katsev, S., Tsandev, I., L'Heureux, I., & Rancourt, D. G. (2006). Factors controlling long-term phosphorus efflux from lake sediments: Exploratory reactive-transport modeling. *Chemical Geology*, 234(1–2), 127–147. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2006.05.001>
- 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(1), 191–202. <https://doi.org/10.1007/s10750-008-9657-9>
- Kleeberg, A., Herzog, C., & Hupfer, M. (2013). Redox sensitivity of iron in phosphorus binding does not impede lake restoration. *Water Research*, 47(3), 1491–1502. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.12.014>
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., Andrinolo, D., Azevedo, S. M., & Oshima, Y. (1999). The first evidence of paralytic shellfish toxins in the fresh water cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxicology*, 37(10), 1359–1373. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(99\)00080-x](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(99)00080-x)
- Larson, C. A., Liu, H., & Passy, S. I. (2015). Iron supply constrains producer communities in stream ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv041>
- Larson, C. A., Mirza, B., Rodrigues, J. L. M. & Passy, S. I. (2018). Iron limitation effects on nitrogen-fixing organisms with possible implications for cyanobacterial blooms. En: *FEMS Microbiol Ecol*, 94(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy046>
- Lehman, P. W., Teh, S. J., Boyer, G. L., Nobriga, M. L., Bass, E., & Hogle, C. (2010). Initial impacts of *Microcystis aeruginosa* blooms on the aquatic food web in the San Francisco Estuary. *Hydrobiologia*, 637(1), 229–248. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-9999-y>
- Liu, X., Lu, X., & Chen, Y. (2011). The effects of temperature and nutrient ratios on *Microcystis* blooms in Lake Taihu, China: An 11-year investigation. *Harmful Algae*, 10, 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.12.002>
- Martigani, F. (2012) Influencia de la deficiencia por nutrientes en el crecimiento y la producción de toxinas de una cianobacteria invasora . Tesis de grado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.
- Martigani Alonso, F. (2017) Fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes como factor promotor de floraciones de cianobacterias tóxicas. Tesis de maestría, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.
- Meeks, J.C. & Elhai, J. (2002). Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 94– 121.

- Molot, L. A. (2017). The effectiveness of cyanobacteria nitrogen fixation: Review of bench top and pilot scale nitrogen removal studies and implications for nitrogen removal programs. *Environmental Reviews*, 25(3), 292-295. <https://doi.org/10.1139/er-2016-0107>
- Molot, L. A., Watson, S. B., Creed, I. F., Trick, C. G., McCabe, S. K., Verschoor, M. J., Sorichetti, R. J., Powe, A. C., Venkiteswaran, J. J., & Schiff, S. L. (2014). A novel model for cyanobacteria bloom formation: The critical role of anoxia and ferrous iron. *Freshwater Biology*. <https://doi.org/10.1111/fwb.12334>
- Molot, Lewis A., Li, G., Findlay, D. L., & Watson, S. B. (2010). Iron-mediated suppression of bloom-forming cyanobacteria by oxine in a eutrophic lake. *Freshwater Biology*, 55(5), 1102–1117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02384.x>.
- Murphy, J. & Riley, J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27: 31-36.
- Myrbo, A., & Ito, E. (2003). Eutrophication and remediation in context: High-resolution study of the past 200 years in the sedimentary record of Lake McCarrons (Roseville, Minnesota). USGS-WRRI 104B National Grants Competition and the Center for Agricultural Impacts on Water Quality, Minnesota, 5.
- Orihel, D. M., Schindler, D. W., Ballard, N. C., Wilson, L. R. & Vinebrooke, R. D. (2016). Experimental iron amendment suppresses toxic cyanobacteria in a hypereutrophic lake. *Ecol Appl*, 26, 1517-1534.
- Padisák J. (1997). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: Worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv Für Hydrobiologie Supplementband Monographische Beitrage*, 107(4), 563–593.
- Padisak, J., Soroczki-Pinter, E. & Reznér, Z. (2003). Sinking properties of some phytoplankton shapes and the relation of form resistance to morphological diversity of plankton - An experimental study. *Hydrobiologia*, 500, 243-257. <https://doi.org/10.1023/A:1024613001147>
- Paerl, H. W., Fulton, R. S., Moisaner, P. H., & Dyble, J. (2001). Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *The Scientific World Journal*, 1, 76–113. <https://doi.org/10.1100/tsw.2001.16>
- Paerl, Hans W., Hall, N. S., & Calandrino, E. S. (2011). Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *The Science of the Total Environment*, 409(10), 1739–1745. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.02.001>
- Paerl, Hans W., & Huisman, J. (2009). Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports*, 1(1), 27–37. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2008.00004.x>
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Giani, A., Figueredo, C. C., Vidal, L., Kruk, C., & Bonilla, S. (2011). Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. *Harmful Algae*, 10(6), 644–653. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.04.016>
- Raven, J. A., Evans, M. C. W., & Korb, R. E. (1999). The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynthesis Research*, 60(2), 111–150. <https://doi.org/10.1023/A:1006282714942>
- Reynolds, C. S. (2006). *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Rodhe, W. (1948). Environmental requirements of fresh-water plankton algae: Experimental studies in the ecology of phytoplankton.
- Rodríguez-Gallego, L. (2011). Eutrofización de las lagunas costeras de Uruguay: Impacto y optimización de los usos del suelo. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/8164>
- Rueter, J. G., & Petersen, R. R. (1987). Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21(3), 435–445. <https://doi.org/10.1080/00288330.1987.9516239>

- Rydin, E., Hyenstrand, P., Gunnerhed, M., & Blomqvist, P. (2002). Nutrient limitation of cyanobacterial blooms: an enclosure experiment from the coastal zone of the NW Baltic proper. *Marine Ecology Progress Series*, 239, 31–36.
- Sarthou, F. V. (2016). Floraciones de cianobacterias: Efectos de la eutrofización y la variabilidad climática. Tesis de Maestría, Universidad de la República (Uruguay) - Facultad de Ciencias.
- Schelske, C. L. (1962). Iron, Organic Matter, and Other Factors Limiting Primary Productivity in a Marl Lake. *Science* (New York, N.Y.), 136(3510), 45–46. <https://doi.org/10.1126/science.136.3510.45>
- Schindler, D. W. (1977). Evolution of Phosphorus Limitation in Lakes. *Science*, 195, 260–262.
- Schindler, David W. (2012). The dilemma of controlling cultural eutrophication of lakes. *Proceedings. Biological Sciences*, 279(1746), 4322–4333. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1032>
- Schindler, David W., Hecky, R. E., Findlay, D. L., Stainton, M. P., Parker, B. R., Paterson, M. J., Beaty, K. G., Lyng, M., & 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 of the United States of America*, 105(32), 11254–11258. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805108105>
- Schlangstedt, M., Bisen, P.S., Dudel, G. & Kohl, J.-G. (1987). Interaction of combined nitrogen availability and light in the regulation of growth, heterocyst differentiation and dinitrogen fixation of the planktic blue-green alga *Anabaena solitaria* Kleb. *Arch. Protistenkd.* 134, 389-396.
- Shi, D., Kranz, S. A., Kim, J.-M., & Morel, F. M. M. (2012). Ocean acidification slows nitrogen fixation and growth in the dominant diazotroph *Trichodesmium* under low-iron conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(45), E3094-3100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1216012109>
- Simpson, F.B. & Burris, R.H. (1984). A Nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science* 224, 1095–1097.
- Sorichetti, R., Creed, I., & Trick, C. (2015). Iron and iron-binding ligands as cofactors that limit cyanobacterial biomass across a lake trophic gradient. *Freshwater Biology*, 61. <https://doi.org/10.1111/fwb.12689>
- Stam, H., Stouthamer, A.H. & Van Verseveld, H.W. (1987). Hydrogen metabolism and energy costs of nitrogen fixation. *FEMS Microbiology Letters*. 46, 73-92.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2), 171–205.
- Stewart, W.D.P & Alexander, G. (1971). Phosphorus availability and nitrogenase activity in aquatic blue-green algae. *Freshw. Biol.* 1, 389–404.
- Sunda, W. G., & Huntsman, S. A. (2015). High iron requirement for growth, photosynthesis, and low-light acclimation in the coastal cyanobacterium *Synechococcus bacillaris*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 561. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00561>
- Twiss, M. R., Auclair, J. C., & Charlton, M. N. (2000). An investigation into iron-stimulated phytoplankton productivity in epilimnetic Lake Erie during thermal stratification using trace metal clean techniques. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57,86–95.
- Valderrama, J. C. (1981). The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine Chemistry*, 10(2), 109–122. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(81\)90027-X](https://doi.org/10.1016/0304-4203(81)90027-X)
- Van de Waal, D. B., Verspagen, J. M. H., Lürling, M., Van Donk, E., Visser, P. M., & Huisman, J. (2009). The ecological stoichiometry of toxins produced by harmful cyanobacteria: An experimental test of the carbon-nutrient balance hypothesis. *Ecology Letters*, 12(12), 1326–1335. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01383.x>

- Vargas, M.A., Rodriguez, H., Morena, J., Olivares, H., Del Campo, J.A., Rivas, J. & Guerro, M.G. (1998). Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *J. Phycol.* 34, 812-817.
- Vico, P., Bonilla, S., Cremella, B., Aubriot, L., Iriarte, A. & Piccini, C. (2020). Biogeography of the cyanobacterium *Raphidiopsis (Cylindrospermopsis) raciborskii*: integrating genomics, phylogenetic and toxicity data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 106824.
- Vidal, L., & Kruk, C. (2008). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: Taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Panam J Aquat Sci*, 3.
- Visser, P. M., Ibelings, B. W., Mur, L. R., & Walsby, A. E. (2005). The Ecophysiology of the Harmful Cyanobacterium *Microcystis*. In J. Huisman, H. C. P. Matthijs, & P. M. Visser (Eds.), *Harmful Cyanobacteria* (109–142). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-3022-3_6
- Walker, J. W., Westerberg, C. E., Schuler, D. J., & Bode, J. A. (1989). Design and Evaluation of Eutrophication Control Measures for the St. Paul Water Supply. *Lake and Reservoir Management*, 5(1), 71–83. <https://doi.org/10.1080/07438148909354683>
- Western, D. (2001). Human-modified ecosystems and future evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5458–5465. <https://doi.org/10.1073/pnas.101093598>
- Wurtsbaugh, W. A., & Horne, A. J. (1983). Iron in eutrophic Clear Lake, California: its importance for algal nitrogen fixation and growth. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 30, 1419–1429.
- Wolk, C.P. (2000) Heterocyst formation in *Anabaena*. In *Prokaryotic Development*. Y.V. Brun, L.J. Shimkets (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology, 83– 104.
- Wolk, C.P., Ernst, A. & Elhai, J. (1994). Heterocyst metabolism and development. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. D.A. Bryant (ed.). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 769– 823.
- Wolter, K. (2010). Restoration of Eutrophic Lakes by Phosphorus Precipitation, with a Case Study on Lake Gross-Glienicker, 85–99.
- Woloszynka, J. (1912). Das Phytoplankton einiger Javanian Seen mit Berücksichtigung des Sawa-Planktons. *Bulletin of the International Academy of Science Cracoviae*, 6, 649–709.
- Xu, H., Zhu, G., Qin, B., & Paerl, H. W. (2013). Growth response of *Microcystis* spp. To iron enrichment in different regions of Lake Taihu, China. *Hydrobiologia*, 700(1), 187–202. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1229-3>
- 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.
- Yeoman, S., Stephenson, T., Lester, J.N. & Perry, R. (1988). The removal of phosphorus during wastewater treatment: A review, *Environmental Pollution*, 49(3), 183-233, ISSN 0269-7491. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0269-7491(88)90209-6)
- Yilmaz, M., Philips, E. J., Szabo, N. J., & Badylak, S. (2008). A comparative study of Florida strains of *Cylindrospermopsis* and *Aphanizomenon* for cylindrospermopsin production. *Toxicon*, 51(1), 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.08.013>
- Zhang T., He J. & Luo X. (2017). Effect of Fe and EDTA on Freshwater Cyanobacteria Bloom Formation. *Water*, 9(5), 326.