

# **Tesina**

## **Licenciatura en Bioquímica**

**Efecto de la relación hierro:fósforo sobre la biomasa de  
fitoplancton dominado por cianobacterias en un lago  
eutrófico**

*Matías Ayala Baltar*

*Orientador: Dr. Luis Aubriot*

*Co-orientadora: Mag. Andrea Somma*

*Sección Limnología – Facultad de Ciencias – Universidad de la República*

## INDICE

1	RESUMEN.....	4
2	INTRODUCCIÓN.....	5
3	OBJETIVO.....	8
3.1	<b>Objetivo general.....</b>	<b>8</b>
3.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>8</b>
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1	Descripción del área de estudio y métodos de muestreo.....	9
4.2	Diseño Experimental.....	9
4.3	Estimación de la biomasa y del crecimiento de fitoplancton.....	10
4.4	Conteo de fitoplancton y determinación de biovolumen.....	12
4.5	Determinación de nutrientes.....	12
4.6	Análisis de datos.....	13
5	RESULTADOS.....	13
5.1	Efecto del FeCl <sub>3</sub> en los nutrientes totales y disueltos.....	13
5.2	Efecto de FeCl <sub>3</sub> en el fitoplancton.....	17
5.3	Efecto de FeCl <sub>3</sub> en cianobacterias.....	20
6	DISCUSIÓN.....	23
6.1	Influencia del agregado de un gradiente de Fe en los nutrientes totales y disueltos.....	24
6.2	Influencia del agregado de un gradiente de Fe en el crecimiento del fitoplancton dominado por cianobacterias.....	25
7	CONCLUSIONES.....	28
8	AGRADECIMIENTOS.....	28
9	ANEXO.....	29
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

## 1 Resumen

En los últimos años, las floraciones de cianobacterias en ecosistemas acuáticos, se han vuelto cada vez más frecuentes con consecuencias negativas en los múltiples usos del agua. Frente a esta problemática ambiental emergente, se han desarrollado varias metodologías para mitigarla, entre las que se destaca la adición de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) para el tratamiento de efluentes, y en algunos casos la aplicación en cuerpos de agua. Con el agregado de hierro (Fe) se busca precipitar al fosfato biodisponible hacia los sedimentos. Por lo tanto, una reducción del fósforo (P) disponible en la columna de agua como nutriente conllevaría a una disminución en el crecimiento de cianobacterias. Sin embargo, los efectos en el ambiente pueden ser muy complejos de predecir, en particular en presencia de cianobacterias capaces de soportar bajas concentraciones de fósforo, y de fijar nitrógeno atmosférico, por la necesidad de Fe para el funcionamiento de la enzima nitrogenasa. Por lo tanto, el Fe puede actuar como controlador del crecimiento a la vez que lo puede estimular por ser un nutriente fundamental para el funcionamiento celular. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la adición de hierro en el crecimiento de fitoplancton (con énfasis en las cianobacterias) y evaluar la concentración óptima de hierro requerida para el control de fitoplancton en un lago artificial situado en Parque Miramar (Canelones) con exceso de N y P. Para esto, se realizó un experimento en laboratorio con una comunidad de fitoplancton natural proveniente de un lago eutrófico al que se le agregaron distintas proporciones de P:Fe: 1:0 (control), 2:1, 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10. Se determinaron las concentraciones de nutrientes totales y disueltos (fósforo total, fosfato, nitrógeno total, nitrato y amonio), y se determinó el crecimiento de la comunidad fitoplanctónica mediante diversos indicadores complementarios: clorofila *a* determinada por métodos analíticos (extracción en etanol), clorofila *a* y ficocianina *in vivo* estimada por fluorescencia, turbidez (densidad óptica a 750 nm) y biovolumen. Para esto último, se realizó la identificación taxonómica de todos los organismos fitoplanctónicos y se midieron las dimensiones necesarias para la determinación del biovolumen en microscopio óptico. Se confirmó la precipitación del P en los tratamientos de mayor relación Fe:P. Se observó un crecimiento sostenido del fitoplancton hasta el día 10, máximo valor para todos los tratamientos. Se determinó la dominancia de cianobacterias (*Aphanizomenon* sp.) en todas las muestras analizadas al microscopio, y un cambio en la composición de cianobacterias que no eran dominantes inicialmente (*Cuspidothrix* sp. y *Raphidiopsis* sp.) según la concentración de coagulante aplicada. Aunque se favoreció un

claro cambio en la composición de cianobacterias, los efectos del cloruro férrico en el crecimiento no son claros para el rango de concentraciones en las que se realizó el presente experimento. Este trabajo muestra que es necesario conocer la comunidad de fitoplancton previo a una posible aplicación de  $\text{FeCl}_3$  e identificar el comportamiento de las cianobacterias en el transcurso del tiempo ante el agregado de las distintas dosis de  $\text{FeCl}_3$ , ya que el agregado de Fe podría aumentar el crecimiento de algunas especies y así, favorecer el desarrollo de floraciones de cianobacterias tóxicas y colonizadoras.

## 2 Introducción

La calidad de las aguas superficiales es uno de los temas ambientales con mayor significancia en todo el mundo (Schindler, 1977). Los efectos de la contaminación por nutrientes, en particular fósforo y nitrógeno, fenómeno denominado eutrofización, ocupan un importante rol en la investigación y gestión estatal, dando como resultado la implementación de medidas de recuperación y mitigación con altos costos (Chorus & Welker, 2021). La eutrofización tiene varias consecuencias en el ambiente, como disminución en la biodiversidad debido al crecimiento excesivo de productores primarios y la restricción de sus usos como la recreación y como fuente de agua potable.

Las floraciones o *blooms* de fitoplancton son producto de un crecimiento abrupto de una o unas pocas especies en un corto período de tiempo (Chorus & Bartram, 1999; Reynolds, 2006). Este fenómeno se ve favorecido bajo determinadas condiciones ambientales como la disponibilidad de nutrientes (Bonilla et al., 2023; Paerl et al., 2016). En particular, las floraciones de cianobacterias son las más frecuentes en ambientes acuáticos continentales de Uruguay y del resto del mundo (Bonilla et al., 2015; Haakonsson et al., 2017; Huisman et al., 2018).

Las cianobacterias pertenecen al dominio Bacteria (eubacterias) y comparten algunas características estructurales con las bacterias heterótrofas, y otras funcionales con las algas. Son los organismos fotosintetizadores aeróbicos más antiguos del planeta (Whitton, 2012). Presentan una amplia diversidad morfológica, encontrándose formas unicelulares, coloniales y filamentosas (Bonilla, 2009; Graham et al., 2009). Además, pueden alcanzar otros niveles de complejidad. Algunas especies pueden presentar células diferenciadas que se forman a partir de una célula

vegetativa: los heterocitos cumplen la función de fijar nitrógeno atmosférico (Wolk et al., 1994) y los acinetes son células de resistencia que se generan como respuesta al estrés ambiental. Las cianobacterias regulan su flotación en la columna de agua a través de varios mecanismos: disminución del número de vesículas de gas a medida que avanza la división celular, colapso de algunas vesículas por aumento de la presión citoplasmática debido a la acumulación de metabolitos de la fotosíntesis y acumulación de polímeros de alto peso molecular para alcanzar la flotación neutra (Reynolds, 2006). La alta biomasa de cianobacterias sumada a la presencia de cianotoxinas puede representar un problema para los otros organismos del medio acuático y para el ser humano (Chorus & Welker, 2021).

El fósforo (P) es el principal nutriente que estimula el crecimiento de cianobacterias ya que es un componente esencial del metabolismo celular, forma parte de la estructura del ATP, ADN y membranas celulares, y puede ser acumulado en gránulos de polifosfato intracelular (Falkner et al., 1989). Algunas cianobacterias pueden fijar nitrógeno (N) atmosférico, lo que les otorga una ventaja ante el resto del fitoplancton ya que pueden acceder a este recurso cuando se encuentra en bajas concentraciones en el agua. Otros nutrientes pueden ser fundamentales para el crecimiento por su relevancia en el funcionamiento enzimático. El hierro (Fe) participa en la fotosíntesis, la síntesis de clorofila, la respiración y la asimilación de nitrógeno (Oliver et al., 2012). En el ambiente acuático, el hierro se encuentra como tricloruro de hierro ( $\text{FeCl}_3$ ) y como ion  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Fe}^{2+}$ , dependiendo de la concentración de oxígeno (Bakker et al., 2016). En condiciones de columna de agua oxigenada, el  $\text{FeCl}_3$  se oxida a  $\text{Fe}^{3+}$ . Este ion puede formar un enlace covalente con  $\text{PO}_4^{3-}$  y de esta manera precipitar al sedimento, reduciendo la carga de fósforo en la columna de agua (Bakker et al., 2016). Si el sedimento es anóxico, el  $\text{FeCl}_3$  no puede oxidarse por completo y se forma  $\text{Fe}^{2+}$ , perdiendo parcialmente su capacidad de unirse a  $\text{PO}_4^{3-}$  y liberando el fósforo que había adsorbido (Golterman, 2001).

Debido a su capacidad de formar diversos compuestos con fósforo soluble, el cloruro de hierro III ( $\text{FeCl}_3$ ) se ha utilizado para el tratamiento de aguas residuales, debido a su propiedad como floculante y gran eficacia en precipitar partículas en suspensión, y específicamente usado para tratamiento terciario y para la potabilización del agua (Yeoman et al., 1988). También ha sido implementado en formas alternativas, como: sulfato poliférrico, sulfato férrico, ferrato y ferroso (Addison et al., 2021; Deppe & Benndorf, 2002; Jančula & Maršálek, 2011; Jiang et al., 1993).

Para eliminar el P disuelto en lagos se han utilizado sales metálicas con Al, Fe, La, y Ca, en diferentes formas y estados de activación y oxidación (Ma et al., 2015). La eficacia y la idoneidad de dichos productos químicos para una determinada masa de agua sigue siendo debatida en la actualidad. En estudios recientes se observó que la eficiencia de  $\text{FeCl}_3$  para 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  $\text{FeCl}_3$  y por ende de Fe a cuerpos de agua 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). El Fe es un cofactor clave para la función de la enzima nitrogenasa encargada de la fijación de N atmosférico (Raven et al., 1999; Rueter & Petersen, 1987). 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).

Por lo tanto, el Fe es un nutriente que puede cumplir dos papeles opuestos en el ambiente acuático, ya que es esencial para el crecimiento de cianobacterias, a la vez que es un elemento cada vez más usado para el control de la eutrofización, mediante el tratamiento terciario de efluentes, y en algunos casos ha sido aplicado directamente a los cuerpos de agua (Kleeberg et al., 2013). El ingreso de cargas más elevadas de Fe a lagos y embalses podría tener consecuencias sobre el desarrollo específico de algunas cianobacterias en relación con otras poblaciones de fitoplancton eucariota. Una vez que parte del Fe que ingresó queda disponible en la columna de agua en valores adecuados para el metabolismo de cianobacterias, podría favorecer su crecimiento, y en particular el proceso de fijación de  $\text{N}_2$  atmosférico. Por lo tanto, la investigación sobre el efecto de la disponibilidad de Fe en muestras naturales con cianobacterias podría dar respuestas acerca de su papel como nutriente y como controlador del crecimiento, previo a su posible aplicación en un cuerpo de agua. En esta tesis nos proponemos evaluar el efecto de distintas concentraciones  $\text{FeCl}_3$  en una comunidad natural de fitoplancton, dominada por cianobacterias, mediante una aproximación experimental en laboratorio.

### 3 Objetivo

#### 3.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto del agregado de  $\text{FeCl}_3$  en el crecimiento de fitoplancton dominado por cianobacterias provenientes de un lago eutrófico.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Objetivo 1: Identificar los distintos grupos de fitoplancton y evaluar el crecimiento en un gradiente de relaciones Fe:P que favorezcan la precipitación de P y floculación de la biomasa algal.

Hipótesis 1: En el rango bajo de adición de  $\text{FeCl}_3$  se producirá una estimulación del crecimiento del fitoplancton debido a que el Fe es usado como nutriente, en rangos intermedios se espera encontrar la limitación del crecimiento por precipitación de P debido a la mayor relación Fe:P, y en rangos altos de  $\text{FeCl}_3$  se producirá la precipitación de parte de la biomasa debido a que el exceso de Fe en solución forma flóculos con la materia orgánica y partículas en suspensión.

- Objetivo 2: Analizar el efecto de los tratamientos con Fe y P en el crecimiento específico de cianobacterias.

Hipótesis 2: Se producirá un aumento de la biomasa de cianobacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  atmosférico en rangos intermedios de agregado de Fe, debido a los mayores requerimientos metabólicos de Fe como cofactor de la enzima nitrogenasa.

## 4 Materiales y Métodos

### 4.1 Descripción del área de estudio y métodos de muestreo

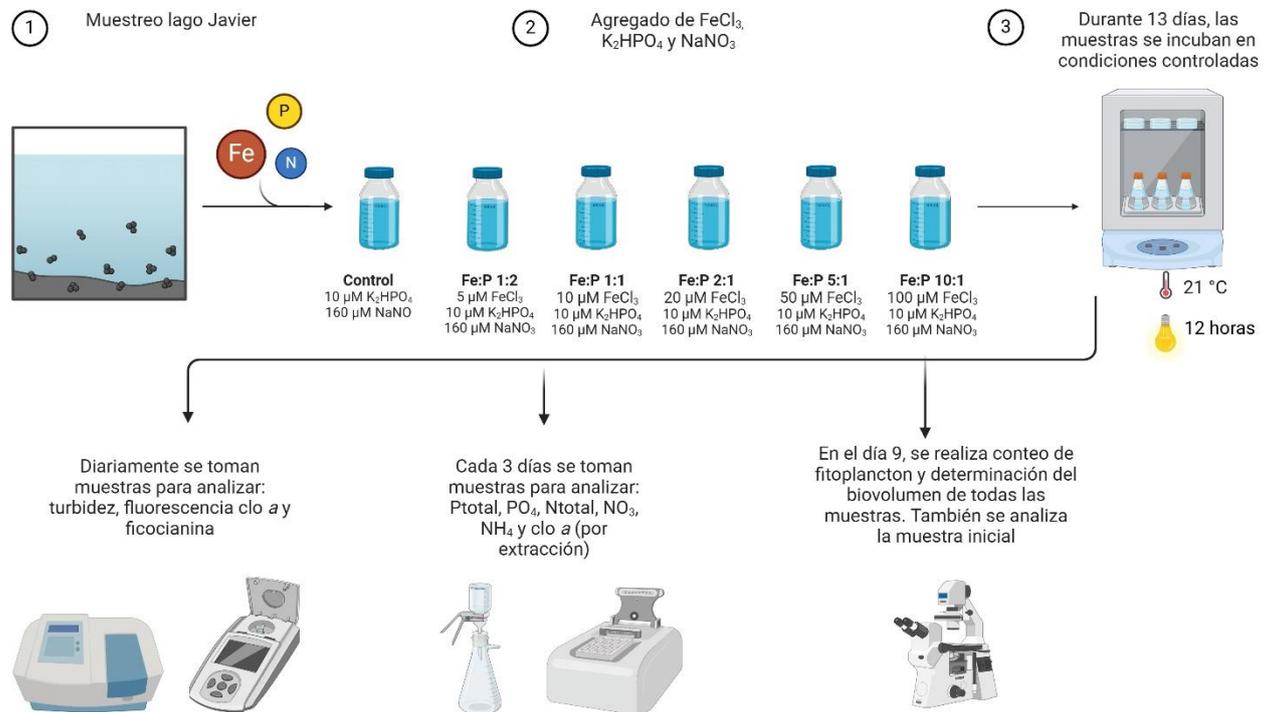
El lago Javier (Lago Calcagno) está ubicado en Parque Miramar en el departamento de Canelones en Uruguay ( $34^{\circ}51'S$ ,  $56^{\circ}02'W$ ). Se trata de un lago artificial que tiene una superficie de 23,5 hectáreas y una profundidad máxima de 11 metros (Fabre et al., 2010). Este lago viene siendo ampliamente estudiado por la Sección Limnología de la Facultad de Ciencias (Universidad de la República) y presenta floraciones frecuentes de cianobacterias (Aguilera et al., 2017; Somma, 2014).

Con la finalidad de obtener una muestra de una comunidad natural de fitoplancton dominada por cianobacterias para hacer el experimento, se recolectó una muestra de agua del lago Javier en un bidón de plástico con capacidad de 20 litros a una distancia aproximada de un metro respecto a la orilla (Figura 2A). Previamente se había enjuagado el recipiente con solución de hipoclorito durante una noche completa, luego cinco veces con agua potable, y finalmente cinco veces con agua destilada. Una vez en el lugar de muestreo, el recipiente fue enjuagado tres veces con agua del lago Javier. También se registraron varios parámetros físico-químicos del lago (en superficie) mediante una sonda HORIBA © U-52 previamente calibrada. Estos datos incluyen concentración de oxígeno, temperatura, pH y turbidez. El muestreo se realizó en primavera.

### 4.2 Diseño Experimental

El experimento se realizó en el laboratorio de la Sección Limnología de la Facultad de Ciencias. El mismo constó de 5 tratamientos con distintas relaciones Fe:P que fueron adicionadas a la comunidad natural del lago Javier. Estos son: control (muestra sin agregado de Fe) y las relaciones Fe:P 1:2, 1:1, 2:1, 5:1 y 10:1. Cada tratamiento se realizó por triplicado de acuerdo con la concentración de P total determinada previamente en la muestra de lago (ver más abajo la metodología). El experimento se llevó a cabo en condiciones constantes y controladas de luz y temperatura:  $60 \mu\text{mol fotón}/\text{m}^2\text{s}$  emitido por luz LED en fotoperíodo de luz de 12 horas y temperatura de  $21^{\circ}\text{C}$ . Se añadió fosfato ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $10 \mu\text{M}$ ) y nitrato ( $\text{NaNO}_3$   $160 \mu\text{M}$ ) para que estos

no sean el nutriente limitante durante la incubación (relación 16N:1P). Se agregó 5  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  para la muestra 1:2 (Fe:P), 10  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  para 1:1 (Fe:P), 20  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  para 2:1 (Fe:P), 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  para 5:1 (Fe:P) y 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  para 10:1 (Fe:P). A continuación, se muestra un resumen del diseño experimental realizado (Figura 1).



**Figura 1.** Diagrama representativo del diseño experimental.

#### 4.3 Estimación de la biomasa y del crecimiento de fitoplancton

La biomasa del fitoplancton es una variable utilizada en estudios de ecología y en monitoreos de calidad de agua. La estimación de la biomasa fitoplanctónica puede ser obtenida de manera indirecta (ej.: medición de concentración de la clorofila *a*, fluorescencia de clorofila *a* y ficocianina y turbidez) o también de manera cuasi-directa, como es el caso de la determinación de biovolumen. En este trabajo, se evaluó el crecimiento en los tratamientos experimentales utilizando diferentes metodologías, las cuales son complementarias entre sí y se describen a continuación.

Durante 13 días, se evaluó el crecimiento diario *in vitro* del fitoplancton mediante mediciones por triplicado de la turbidez (750 nm) utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 60S en celdas de 1 cm. Este parámetro es un indicador indirecto (turbiedad de la muestra) de la biomasa fitoplanctónica y estima la concentración de partículas en suspensión de la muestra. Diariamente, se midió la fluorescencia *in vivo* de la clorofila *a* (indicador indirecto de la biomasa fitoplanctónica total) y ficocianina (indicador indirecto de la biomasa de cianobacterias) mediante el fluorómetro Turner Aquafluor (500 nm y 620 nm respectivamente). La clorofila *a* es el pigmento común a todos los organismos productores primarios, por lo tanto, es un indicador de la biomasa del fitoplancton total; mientras que la ficocianina es un pigmento exclusivo de cianobacterias (en agua dulce) por lo que es un indicador de este grupo taxonómico. Debido a que es un método fluorométrico aplicado a organismos vivos (sin extracción de los pigmentos), existen interferencias provocadas por la turbiedad de la muestra y por la densidad propia de estos organismos (autosombreado) (Cremella et al., 2018). Se utilizó el modelo de Cremella et al. (2018) para realizar la estimación de clorofila *a* total y de cianobacterias a partir de los valores de fluorescencia medidos (Anexo 2).

El método clásico para la determinación de clorofila *a* es mediante su extracción en un solvente, clarificación de la muestra, acidificación, y posterior medición en espectrofotómetro (ISO 10260, 1992). La diferencia entre la absorbancia de la clorofila acidificada (pigmento degradado) y no acidificada (total) permite determinar la clorofila *a*. Cada 3 días se tomaron muestras para medir la concentración de la clorofila *a* por extracción. Para esto, se filtraron las muestras (60 mL aproximadamente) con filtros MGF Munktell de 0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su extracción. La extracción se realizó en oscuridad para preservar al máximo los pigmentos de clorofila según el protocolo de la norma Internacional ISO 10260 de 1992 (método de etanol caliente). La absorbancia a 665 nm fue medida en espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 60S en celdas de 1 cm. Estas mediciones se hicieron por triplicado para cada tratamiento en cada día analizado.

Asimismo, se evaluó la biomasa específica de cada especie o taxa encontrada en el día de máximo crecimiento del experimento mediante análisis de muestras al microscopio óptico, identificación

taxonómica de organismos fitoplanctónicos y estimación de su biovolumen específico como se describe en los siguientes puntos.

#### 4.4 Conteo de fitoplancton y determinación de biovolumen

Se realizó un conteo de fitoplancton del inóculo inicial y de las 18 muestras correspondientes al día en que se registró el máximo crecimiento de biomasa (día 9: 3 réplicas por tratamiento). Las muestras fueron fijadas con lugol y conservadas en oscuridad hasta su procesamiento.

La abundancia de organismos (org/mL) fue cuantificada según Sournia (1978) y Hotzel & Croome (1999) utilizando cámaras de sedimentación Sedwick - Rafter de 1 mL en microscopio óptico invertido Olympus CKX41. El conteo se realizó por campos al azar hasta alcanzar 100 organismos de la misma especie o 400 organismos totales (Sournia, 1978).

El volumen de los individuos de cada réplica ( $\text{mm}^3$ ) se calculó a partir de las medidas de individuos (diámetro, largo, ancho, etc.) y aproximando a la figura geométrica correspondiente según Hillebrand et al. (1999). El biovolumen de cada réplica ( $\text{mm}^3/\text{L}$ ) fue estimado multiplicando la abundancia por el volumen promedio de los organismos de esa réplica de acuerdo a lo establecido por Hillebrand (Hillebrand et al., 1999). El biovolumen es considerado uno de los indicadores más informativos de la comunidad fitoplanctónica (Bonilla & O'Farrell, 2023).

#### 4.5 Determinación de nutrientes

Para la determinación de nutrientes se tomaron muestras del momento inicial, los días 3, 6, 10 y 13. Se filtró una alícuota de volumen conocido (60 mL aproximadamente) de cada réplica a través de un filtro de fibra de vidrio MGF Munktell. Una vez realizado el procedimiento, se procedió a congelar a  $-20^\circ\text{C}$  las muestras filtradas, junto con las muestras sin filtrar y el material obtenido del filtro (para clorofila *a*) hasta que se realicen los análisis correspondientes.

A partir de las muestras de agua filtradas se determinó la concentración de nutrientes disueltos. En el caso del amonio, se utilizó el método de azul de indofenol (Koroleff, 1970). Para fosfato el

método utilizado fue el de molibdato de amonio (Murphy & Riley, 1962). En el caso de nitrato se utilizó el método de salicilato de sodio (Müller & Wiedemann, 1955) (Anexo 2).

Para la determinación de los nutrientes totales, se utilizaron las muestras sin filtrar. Fósforo y nitrógeno total se determinaron por el método de Valderrama (1981) mediante la oxidación con persulfato de potasio en autoclave por 30 min. Luego de la oxidación, cada nutriente fue analizado como fosfato y nitrato.

#### 4.6 Análisis de datos

Los análisis estadísticos para determinar si las diferencias entre los valores de las muestras se tratan de una diferencia mayor a lo que se esperaría por efecto aleatorio fueron realizados mediante Kruskal-Wallis (análisis de varianza de una vía por rangos) y las comparaciones cruzadas se analizaron mediante el método de Holm-Sidak con el fin de comparar las diferencias entre los grupos (tratamientos o días de experimento). Todos los análisis descritos se realizaron usando SigmaPlot (versión 11.0).

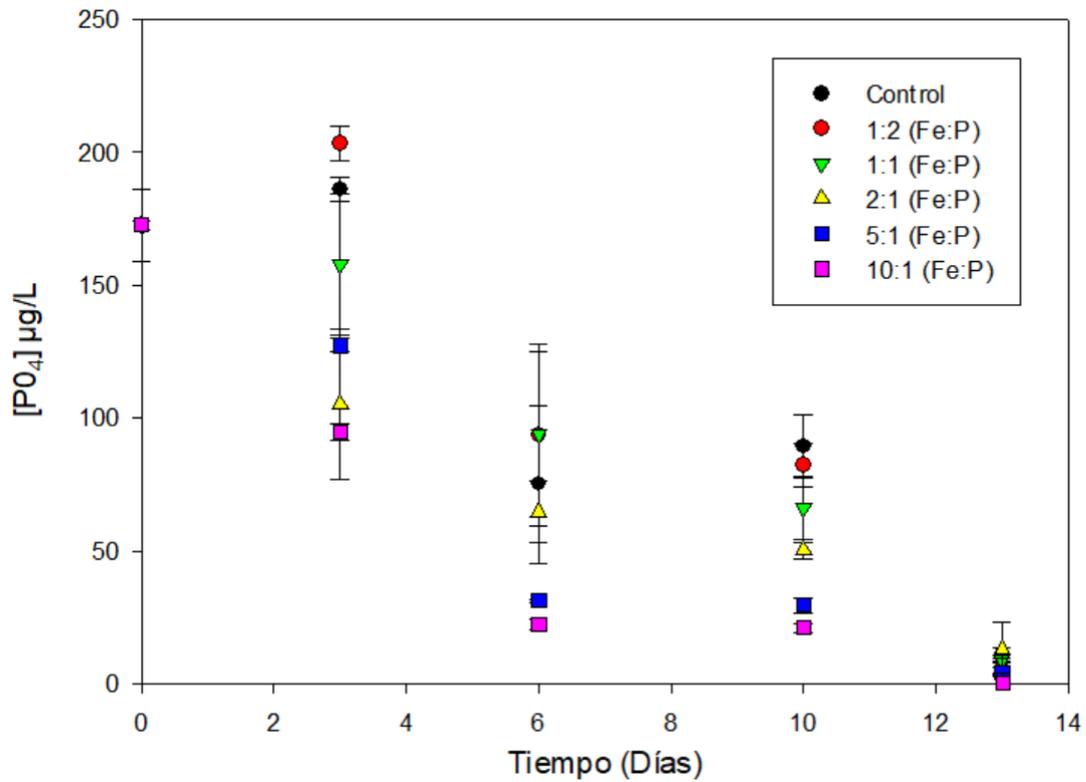
## 5 Resultados

### 5.1 Efecto del FeCl<sub>3</sub> en los nutrientes totales y disueltos

Se observaron diferencias significativas para el fósforo total (figura 2), a partir del día 3 para la relación 10:1 respecto al control y la relación 1:2. En el día 6, se mantuvo prácticamente la misma tendencia y en el día 10 se observó cómo los tratamientos con mayor relación Fe:P (10, 5 y 2) se diferenciaron respecto al resto (Figura 2, tabla 1).



Respecto a los análisis de fosfato ( $\text{PO}_4$ ) se observó algo similar que el caso anterior, pero la significancia de la muestra 10:1 respecto a otros tratamientos se concretó a partir del día 6. Con el paso de los días, esta tendencia se replicó en las muestras con mayor relación Fe:P (10, 5 y 2) (Figura 3, tabla 2).

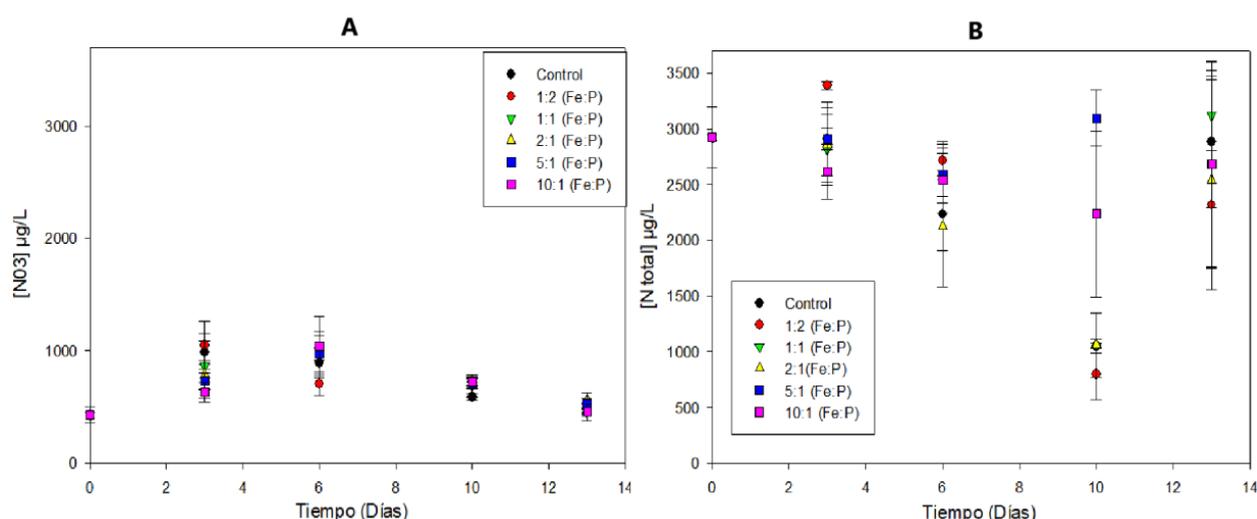


**Figura 3.** Fósforo reactivo soluble (PRS) ( $\mu\text{g/L}$ ) en función del tiempo (días). Cada color representa una relación Fe:P ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ ;  $n=3$ ).

**Tabla 2.** Valores de p y estadísticos F obtenidos mediante Kruskal-Wallis y valores de p de las interacciones pareadas entre tratamientos obtenidos mediante el método de Holm-Sidak para los análisis de fosfato de los días 6 y 9. No se muestran los estadísticos para los días 3 y 13 ya que no presentaron diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis.

Fosfato (PO <sub>4</sub> )												
Día 6 DF=5, F=5,363 y P=0,008						Día 9 DF=5, F=38,301 y P=<0,001						
Tratamiento	C	1:2	1:1	2:1	5:1	10:1	C	1:2	1:1	2:1	5:1	10:1
C		0,344	<b>0,006</b>	0,584	<b>0,037</b>	<b>0,015</b>	0,273	<b>0,003</b>	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>
1:2			0,992	0,148	<b>0,006</b>	<b>0,003</b>		<b>0,029</b>	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>
1:1				0,145	<b>0,006</b>	<b>0,002</b>			<b>0,025</b>	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>
2:1					0,099	<b>0,043</b>				<b>0,007</b>	< <b>0,001</b>	< <b>0,001</b>
5:1						0,648						0,206
10:1												

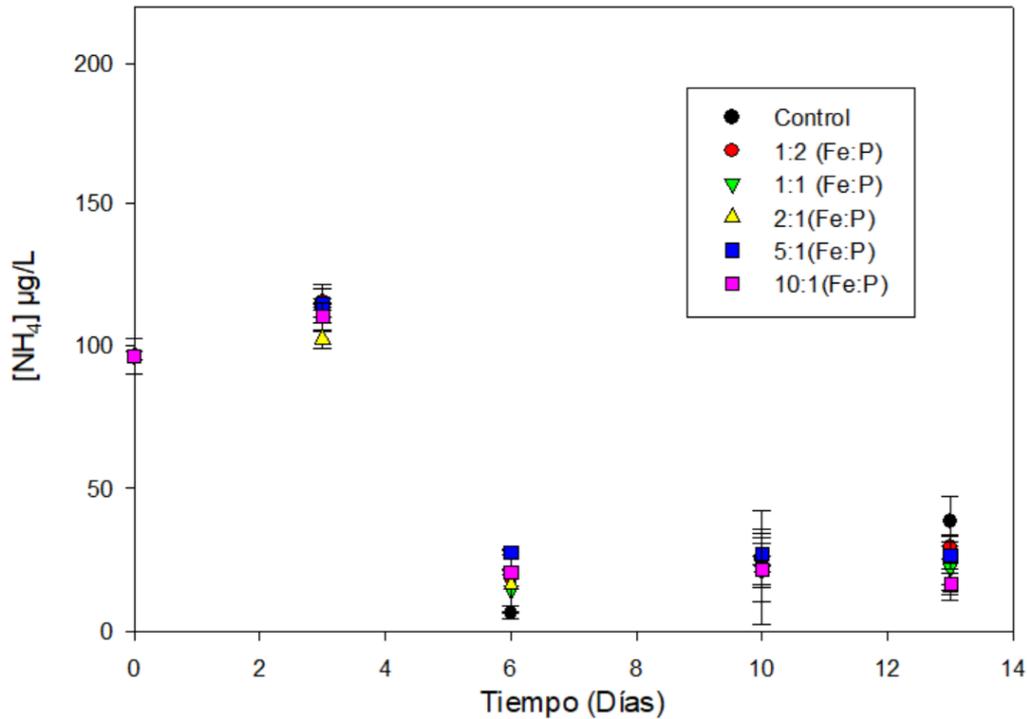
El valor de la muestra inicial para NT común a todos los tratamientos fue de  $2923 \pm 272$   $\mu\text{g N-NT/L}$  y para NO<sub>3</sub> fue de  $429 \pm 72$   $\mu\text{g/L}$ . No se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 4). Ambos nutrientes estuvieron presentes en concentraciones elevadas en las etapas iniciales y finales.



**Figura 4. A:** Variación temporal del nitrato (NO<sub>3</sub>,  $\mu\text{g/L}$ ) en los tratamientos. Cada color representa una relación Fe:P ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ ; n=3). **B:** Variación temporal del nitrógeno total (NT,  $\mu\text{g/L}$ ) en los tratamientos. Cada color representa una relación Fe:P ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ ; n=3)

En cuanto a la concentración de amonio (NH<sub>4</sub>), se observó una caída en todos los tratamientos a

partir del día 3. Mediante el análisis Kruskal-Wallis y su post-hoc Holm-Sidak no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 5).



**Figura 5.** Amonio ( $\text{NH}_4$ ) ( $\mu\text{g/L}$ ) en función del tiempo (días). Cada color representa una relación Fe:P ( $x \pm \text{sd}$ ;  $n=3$ ).

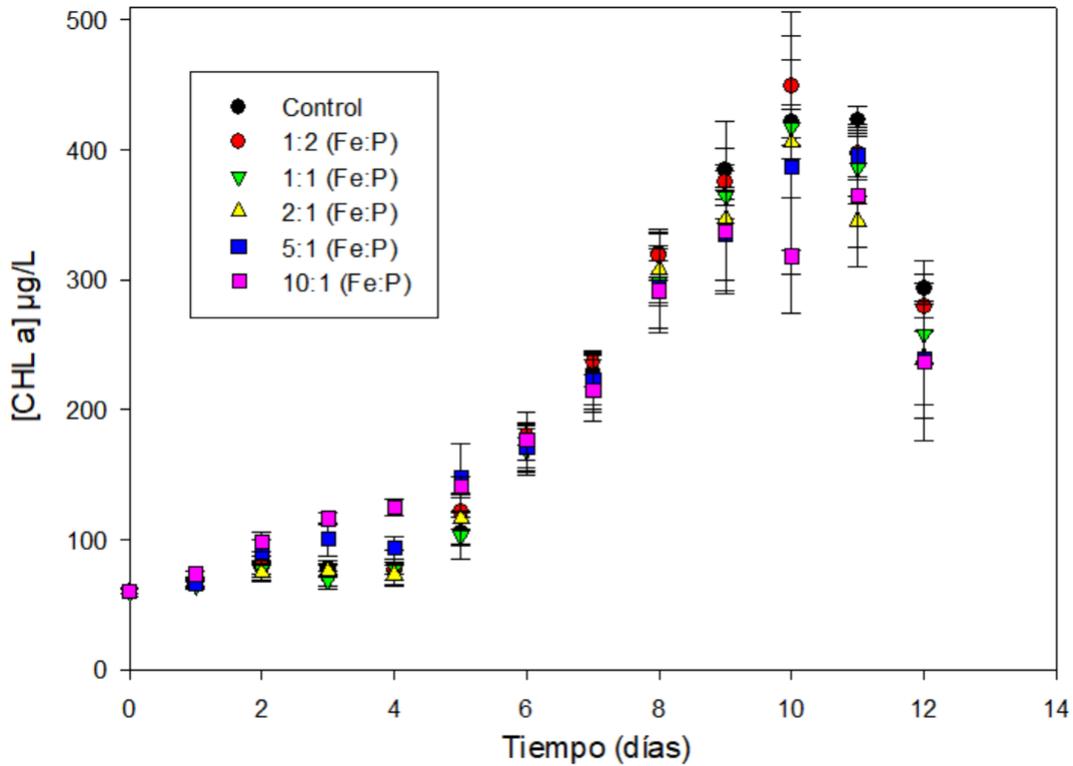
No se observaron diferencias entre tratamientos en los valores de pH a lo largo de todo el experimento. Se observó aumento gradual de este parámetro (en todos los tratamientos) con el transcurrir de los días debido a la actividad fotosintética en un lugar cerrado con alta concentración de biomasa y con un intercambio limitado de gases (Tabla 1A).

## 5.2 Efecto de $\text{FeCl}_3$ en el fitoplancton

En los tratamientos 5:1 y 10:1 se observó un aumento de la densidad óptica o turbidez provocada por la adición de las mayores concentraciones aplicadas de la sal de hierro (Figura 1A).

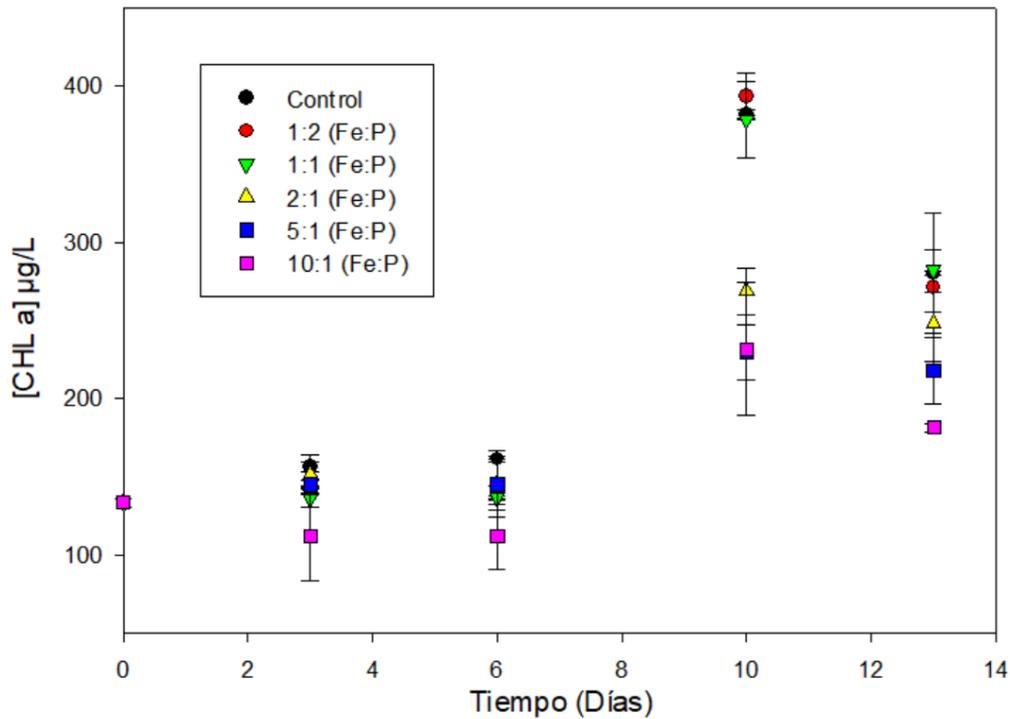
Mediante medición por fluorescencia se observó un aumento de la clorofila *a* entre el día 0 (muestra inicial) hasta el día 11, obteniéndose un máximo entre los días 9 y 11 (figura 6). Luego

se observó una disminución en todos los tratamientos. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos.



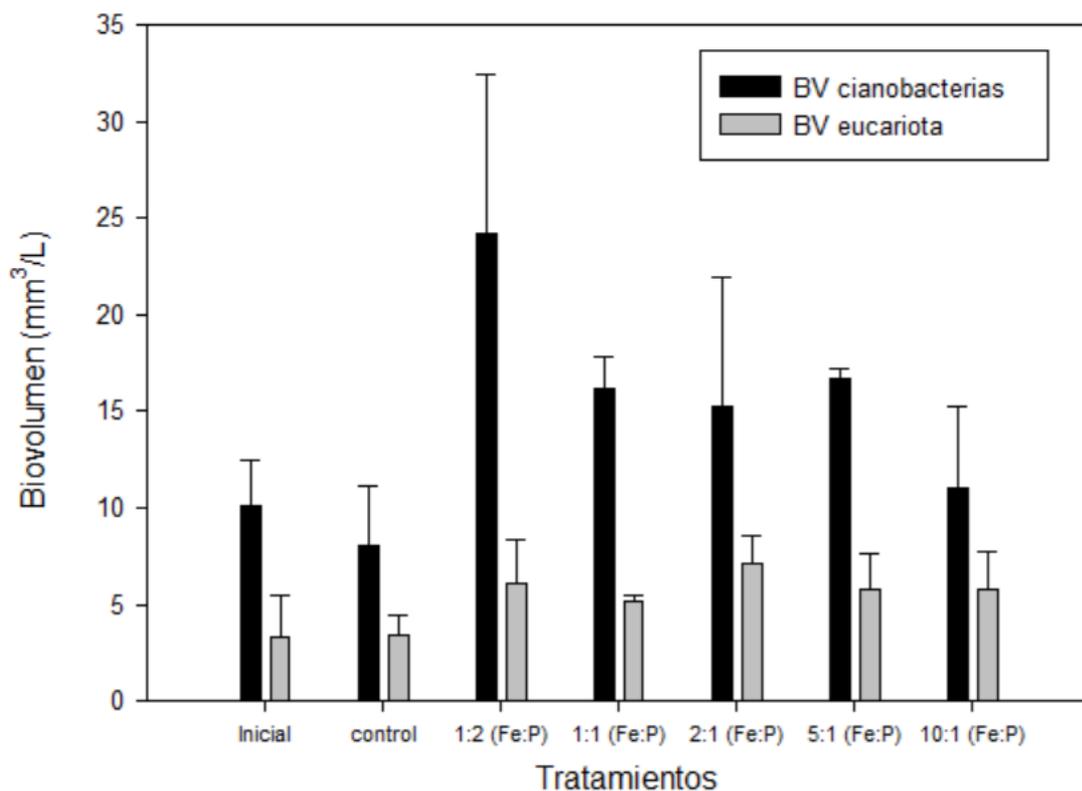
**Figura 6.** Clorofila *a* estimada por fluorescencia ( $\mu\text{g/L}$ ) en función del tiempo (días). Cada color representa una relación Fe:P ( $x \pm \text{sd}$ ;  $n=3$ ).

Como se observa en la figura 7, los resultados de clorofila *a* medida por extracción presentaron un máximo de crecimiento en el día 10, y una caída en el día 13. En los días 3 y 6 no se observaron diferencias entre los tratamientos. En el día 10, en las muestras con mayor relación Fe:P (2, 5 y 10) se observó una disminución con respecto al resto de los tratamientos (control, 1:2 y 1:1). Debido a que en este caso contamos con solo 2 réplicas por muestra, para el análisis estadístico se compararon los datos de la muestra control, 1:2 y 1:1 vs 10:1, 5:1 y 2:1 mediante ANOVA de una vía con el post-hoc Holm-Sidak. Se observaron que estos grupos fueron significativamente diferentes ( $p=0,004$ ) y los indicadores obtenidos del análisis son los siguientes:  $DF=1$ ,  $F=34,700$  y  $P=0,004$ .



**Figura 7.** Clorofila  $a$  ( $\mu\text{g/L}$ ) cuantificada por extracción en función del tiempo (días). Cada color representa una relación Fe:P ( $x \pm \text{sd}$ ;  $n=2$ ).

El biovolumen del fitoplancton obtenido por conteo en el día 9 (máximo de crecimiento según estimación de % cianobacterias) presentó diferencias significativas entre tratamientos según el análisis Kruskal-Wallis y su post-hoc Holm-Sidak. La muestra inicial y las relaciones Fe:P: 1:2 ( $p<0,001$ ), 2:1 ( $p=0,042$ ) y 5:1 ( $p=0,039$ ) presentaron diferencias significativas (Figura 8).

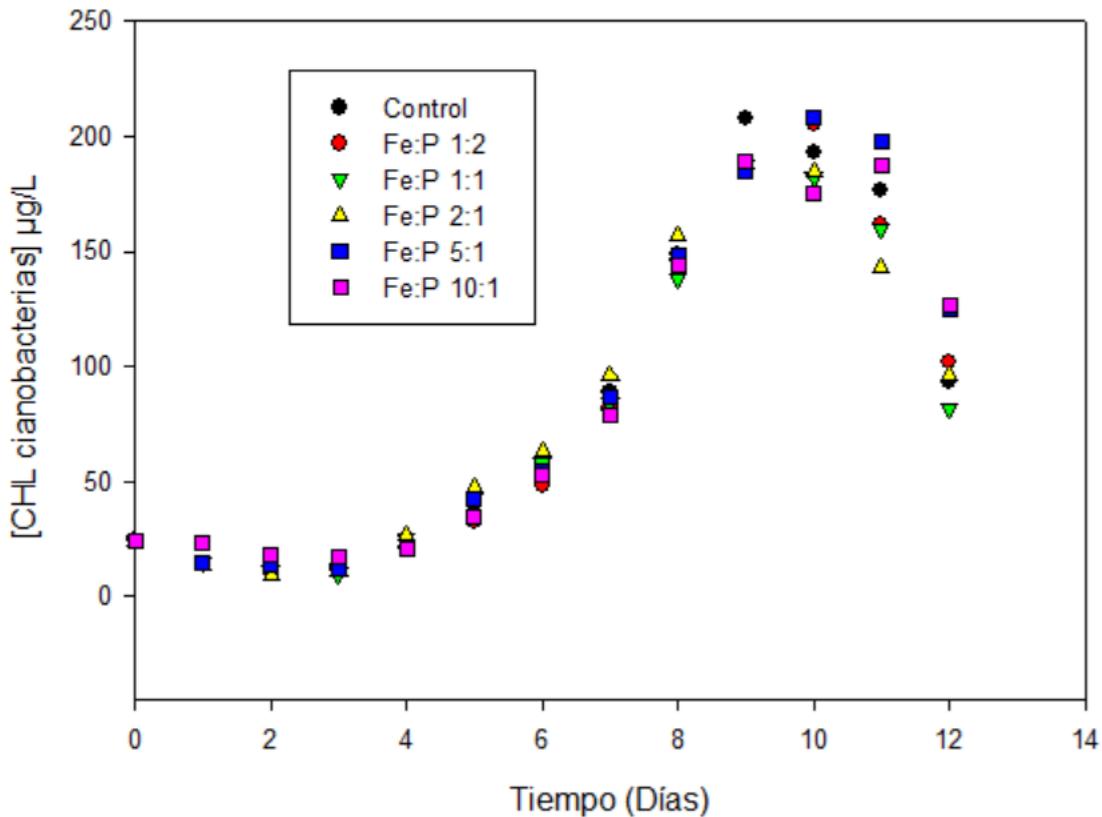


**Figura 8.** Biovolumen de cianobacterias y fitoplancton eucariota (mm<sup>3</sup>/L) en la muestra inicial y en cada tratamiento de Fe:P en el día 9 del experimento ( $\bar{x} \pm sd$ ; n=3).

El biovolumen de cianobacterias, fue mayor respecto al biovolumen de fitoplancton eucariota para todos los tratamientos. Sin embargo, solo se confirmaron diferencias en el día 9 entre el control y el tratamiento 1:2 ( $p < 0,001$ ) y entre los tratamientos 1:2 y 10:1 ( $p = 0,003$ ) según el análisis Kruskal-Wallis y su post-hoc Holm-Sidak (Figura 8).

### 5.3 Efecto de FeCl<sub>3</sub> en cianobacterias

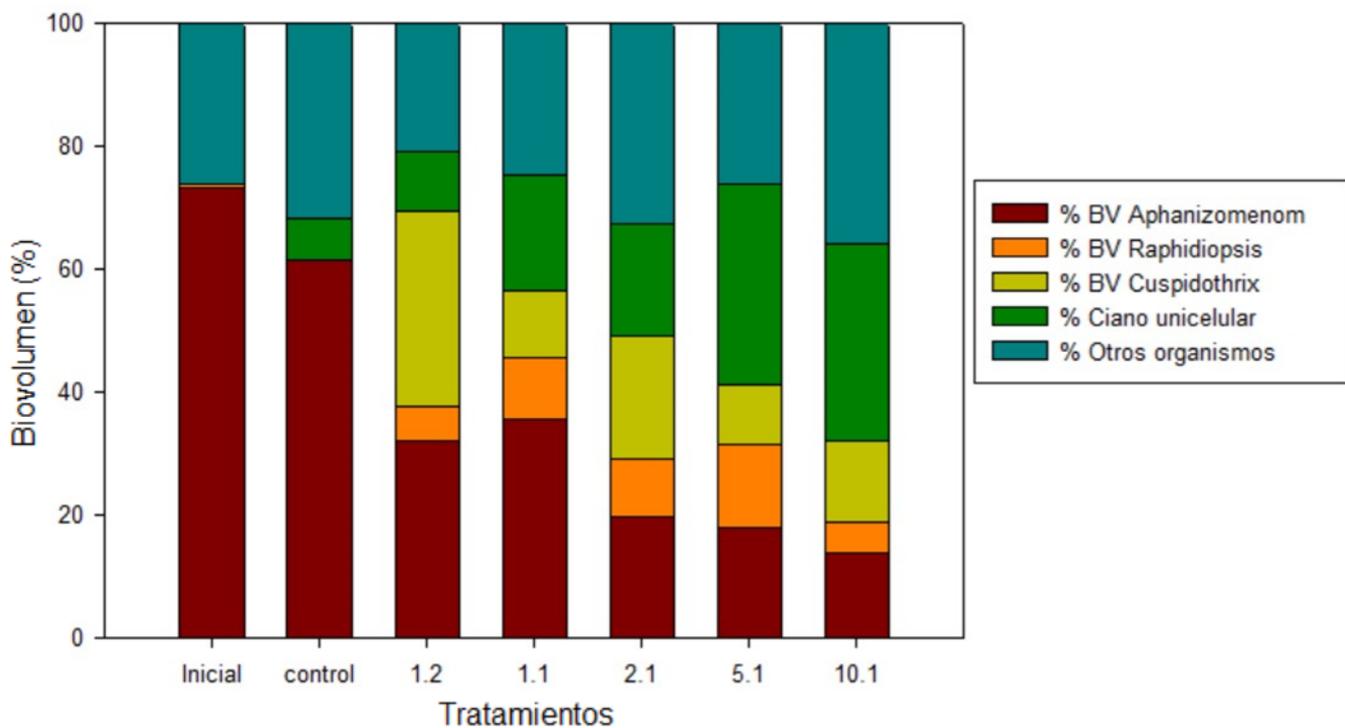
Se obtuvo una mayor concentración de clorofila *a* de cianobacterias para todos los tratamientos en el día 9. Se puede observar que a partir del día 10, los valores en 5:1 y 10:1 son levemente mayores respecto al resto de los tratamientos. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos.



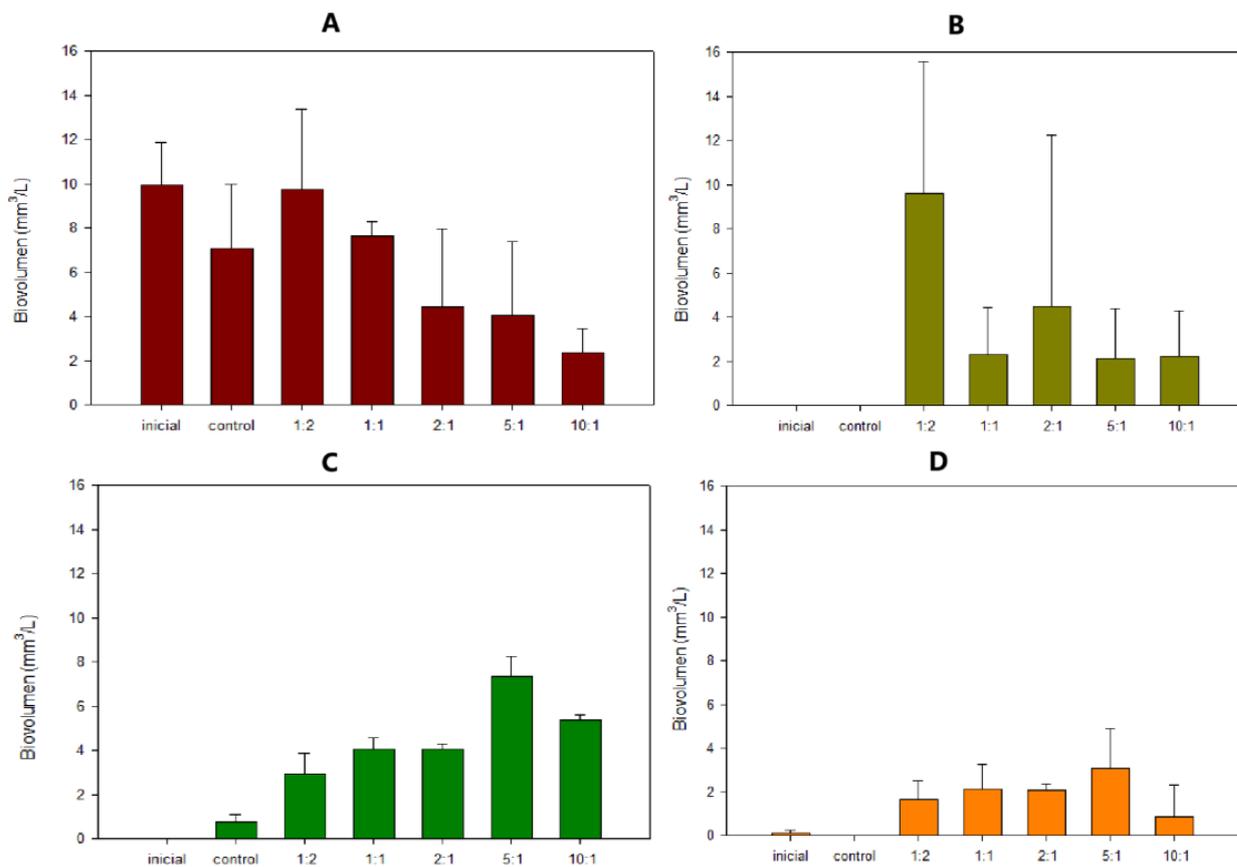
**Figura 9.** Clorofila *a* de cianobacterias en base a las mediciones de la fluorescencia en función del tiempo (días). Cada color representa una relación Fe:P. Los símbolos indican el promedio de las réplicas (n=3).

El análisis de los géneros que aportan mayor biovolumen a la comunidad fitoplanctónica se muestran en la figura 10 y 11. *Aphanizomenon* sp. presentó una dominancia inicial clara del 73,33 % respecto al resto de los organismos (figura 10) con el mayor biovolumen específico registrado en el experimento ( $9,92 \pm 1,93 \text{ mm}^3/\text{L}$ ) (figura 11). Esta situación es similar para el tratamiento control (día 9), con un valor de 61,62% respecto al resto de los organismos de la comunidad y un biovolumen de  $7,07 \pm 2,90 \text{ mm}^3/\text{L}$  de *Aphanizomenon* sp. En el resto de los tratamientos del día 9 *Aphanizomenon* sp. compartió la dominancia con *Cuspidothrix* sp., *Raphidiopsis* sp. y cianobacterias unicelulares. Cabe mencionar que *Cuspidothrix* sp., *Raphidiopsis* sp. y cianobacterias unicelulares prácticamente no estuvieron presentes en las muestras inicial y control y luego fueron observados en el día 9 en todos los tratamientos que tienen agregado de hierro. *Cuspidothrix* sp. presentó su máximo de crecimiento en el tratamiento 1:2 del día 9 (biovolumen =  $9,61 \pm 5,97 \text{ mm}^3/\text{L}$ , corresponde a un 31,70% del total de biomasa de fitoplancton). Para *Raphidiopsis* sp., el máximo biovolumen fue de  $3,08 \pm 1,82 \text{ mm}^3/\text{L}$  y

corresponde al 13,68% del total, en el tratamiento 5:1. Se observó que las cianobacterias unicelulares aumentaron su presencia a medida que se incrementó el agregado de hierro, obteniendo su máxima biomasa en los tratamientos 10:1 y 5:1 del día 9. Los resultados fueron  $5,39 \pm 0,23 \text{ mm}^3/\text{L}$  (31,95%) y  $7,35 \pm 0,90 \text{ mm}^3/\text{L}$  (32,71%) respectivamente.



**Figura 10.** Porcentaje del biovolumen (%) por género en la muestra inicial y en los distintos tratamientos Fe:P del día 9. Se muestran los géneros que aportan el mayor porcentaje de biomasa al total de la comunidad. Otros organismos representan la suma del biovolumen de eucariotas y cianobacterias que se encuentran en menor concentración que las mencionadas anteriormente.



**Figura 11.** Biovolumen ( $\text{mm}^3/\text{L}$ ) de las cianobacterias más importantes en términos de biomasa para cada tratamiento (**A:** *Aphanizomenon* sp.; **B:** *Cuspidothrix* sp.; **C:** cianobacterias unicelulares; **D:** *Raphidiopsis* sp.) ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ ;  $n=3$ ).

## 6 Discusión

El presente trabajo muestra el efecto dual del uso de Fe como posible tratamiento frente al crecimiento de fitoplancton dominado por cianobacterias provenientes de un lago eutrófico, ya que puede actuar como un floculante eficaz, pero también como un nutriente esencial para el crecimiento de cianobacterias. El rango de las mayores concentraciones aplicados de  $\text{FeCl}_3$  (2:1, 5:1 y 10:1) presentaron resultados prometedores para la utilización en el control del estado trófico de un lago; sin embargo, no sería eficaz para controlar especies de cianobacterias tolerantes a niveles bajos de P y altos de Fe, como es el caso de los géneros *Cuspidothrix*, *Raphidiopsis* y cianobacterias unicelulares, sino que podría favorecer su crecimiento y dominancia en la comunidad de fitoplancton.

## 6.1 Influencia del agregado de un gradiente de Fe en los nutrientes totales y disueltos

El crecimiento de cianobacterias suele estar limitado por nitrógeno y/o fósforo, en sus formas disueltas (Schindler, 1977). Estos organismos, son capaces de utilizar como fuente de nitrógeno: nitrato, nitrito, amonio y determinadas especies, también urea (Frías et al., 1994). Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron una caída en la concentración de amonio ( $\text{NH}_4$ ) en todos los tratamientos por igual a partir del día 6. La misma, podría deberse a que es la forma de N energéticamente menos costosa de asimilar y, además, es rápidamente utilizado por las algas y cianobacterias. Contrario es el caso del nitrato ( $\text{NO}_3$ ) y NT que estuvieron presentes desde el inicio y hasta el final del experimento, sin diferencias entre tratamientos. Por lo tanto, podemos hipotetizar que el nitrógeno no fue el nutriente limitante del experimento.

Diferentes investigaciones sugieren que es posible disminuir las concentraciones de PT y P biodisponible mediante la adición de  $\text{FeCl}_3$  a cuerpos de agua (Boers et al., 1992; Gächter & Müller, 2003; Katsev et al., 2006). En el presente trabajo se confirmó la precipitación del P en los tratamientos de mayor relación Fe:P. Desde el día 3, se observaron diferencias significativas a nivel de PT. A partir del día 6 y en adelante, tanto PT como los fosfatos, mostraron una disminución significativa respecto a la muestra control y los tratamientos de menor relación Fe:P. Según Kleeberg et al. (2013) se determinó que la relación mínima para tener un impacto en la restauración de un lago debe ser de 1P:5Fe en los sedimentos, en nuestro caso, ese ratio se alcanzó en los tratamientos, simulando las condiciones de la columna de agua de un lago.

Este estudio se centró en el uso de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), pero existen otros floculantes para la precipitación de fósforo, como es el caso de sulfato férrico  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , en el cual se obtuvieron resultados similares (Le et al., 2021). Otros estudios han utilizado Ca, en sus formas  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y  $\text{CaCO}_3$ , como alternativa para la eliminación del P (Zhang et al., 2001). Como el fósforo sería el nutriente limitante en el lago Javier, se esperaría que la adición de una sal que precipite el fósforo, podría generar una disminución en el crecimiento del fitoplancton en general. Sin embargo, la adición de concentraciones elevadas de Fe puede resultar en respuestas complejas, e incluso opuestas a lo esperado, con un posible cambio en la dominancia hacia cianobacterias tolerantes al estrés por bajas concentraciones de P.

## 6.2 Influencia del agregado de un gradiente de Fe en el crecimiento del fitoplancton dominado por cianobacterias

Los resultados de clorofila *a* por extracción mostraron que, al precipitar el P del medio existió una diferencia en el crecimiento del fitoplancton: a mayor relación Fe:P, menor clorofila *a*. Esto se observó en el día 10, donde el valor de este indicador fue de 381,84 µg clorofila *a*/L en la muestra control y en la relación 10:1 fue de 231,47 µg clorofila *a*/L (Figura 7). De todas maneras, todos los valores obtenidos están por encima de 50 µg/L, que es el nivel de alerta 2 para aguas recreativas (Chorus & Welker, 2021). Esta tendencia no se observó en la medición de clorofila *a* obtenida por fluorescencia. Esto puede explicarse por la presencia de flóculos de Fe que aumentan la turbidez al momento de realizar la medición o por las elevadas concentraciones del pigmento que limitan la cuantificación fluorométrica (Cremella et al., 2018). El efecto de los flóculos se evidenció en la densidad óptica medida a 750 nm, que generaron la precipitación de P y biomasa, afectando principalmente a los tratamientos 10:1 y 5:1. Por lo tanto, es importante que se utilicen diferentes metodologías complementarias para obtener resultados consistentes. En nuestro caso, la evaluación del crecimiento global con el método clásico de extracción del pigmento y medición en espectrofotómetro brindó resultados concluyentes.

Además, la cuantificación por conteo y el cálculo de biovolumen al microscopio óptico de la comunidad fitoplanctónica permitió determinar la biomasa específica de las poblaciones de cianobacterias y eucariotas y conocer su dominancia a lo largo del experimento. En todos los casos, hubo una dominancia de cianobacterias, representando en la fracción total entre el 65% (10:1) y el 79,9% (1:2). Este resultado podría explicarse debido a que, la caída de P por la precipitación con Fe, genera limitación en el crecimiento. Al mismo tiempo, podría ser compensado por la presencia de cianobacterias fijadoras de N, las cuales necesitan Fe y también P. Al existir escasez de este último, se podría activar algún mecanismo de compensación con otro nutriente que esté presente en el medio en exceso (Aubriot, 2019), como es el caso del nitrato y del Fe. Esto podría justificar la codominancia observada en las muestras del día 9 con agregado de floculante. Este efecto, no se observó en la muestra inicial y control (sin agregado de Fe), donde se aprecia la dominancia de *Aphanizomenom* sp. respecto al resto de los organismos. Otros estudios recientes, concluyen que *Aphanizomenom* es susceptible a cambios de P en el medio, por lo que coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo (Le et al., 2021). Por lo tanto, como no esperamos una limitación del

crecimiento por N (ya que fue adicionado en las incubaciones), el cambio en la dominancia de otras cianobacterias podría deberse a los mayores requerimientos de Fe por estos organismos.

Algunas especies presentan una gran eficiencia en el uso del fosfato, lo que les permite crecer en ambientes con baja disponibilidad de este nutriente (Aubriot et al., 2011; Dolman et al., 2012). Tal es el caso de *Raphidiopsis raciborskii*, que puede modificar su estrategia de crecimiento y adaptarse a una amplia variedad de condiciones ambientales, lo que le brinda una ventaja competitiva frente a otras especies de fitoplancton, generando elevadas biomásas en ecosistemas limitados por nutrientes y/o con aportes fluctuantes (Amaral et al., 2014; Bonilla et al., 2012; Briand et al., 2004; Galvanese et al., 2019). Uno de los mecanismos que podría explicar el aumento de *Raphidiopsis* sp. es la alta afinidad por el fosfato y su capacidad de almacenar concentraciones elevadas de polifosfato (Isvánovics et al., 2000). Lo antes expuesto, respalda los resultados de este experimento, donde esta especie obtuvo valores menores al límite de detección en la muestra control e inicial (1 célula/mL) y con el agregado de  $\text{FeCl}_3$ , crece y obtiene su máximo de biomasa en 3,08 mm<sup>3</sup>/L. El caso de *Cuspidothrix* es similar al de *Raphidiopsis raciborskii*, sin embargo, no se encontró bibliografía que pueda demostrar o explicar el fenómeno ocurrido. Por lo tanto, el caso de *Cuspidothrix* sería novedoso y amerita futuras investigaciones para dilucidar sus preferencias ambientales, en particular con altas concentraciones de Fe.

Es importante destacar que en este trabajo se cuantificaron varios indicadores (directos e indirectos) de la comunidad de fitoplancton con diferentes metodologías, lo que permitió comparar sus resultados y obtener una visión integral y más completa del fenómeno a estudiar. Por ejemplo, el valor de biovolumen total obtenido por conteo presentó un gran desvío estándar. Una de las explicaciones podría ser que los organismos están en fase de crecimiento; la otra, sería por la sumatoria de pequeños errores en el conteo, en las mediciones de las dimensiones lineales al microscopio y posteriores cálculos para obtener el biovolumen (Alcántara et al., 2018). Este proceso implica medir a los organismos, luego calcular el volumen promedio (un error en una medición ahora se eleva a la 3) para multiplicarlo por la cantidad de organismos contabilizados (Bonilla & O'Farrell, 2023). Sumado a lo mencionado anteriormente, la falta de personal técnico o de equipamiento adecuado en laboratorios puede ser una limitante para el uso de este indicador (Bonilla & O'Farrell, 2023). De todas maneras, el valor diferencial que permite obtener esta metodología es la cuantificación por especie y el comportamiento de estas, por ejemplo, con los cambios de concentraciones en un ensayo con un floculante ( $\text{FeCl}_3$ ). En forma complementaria, la

clorofila *a* por extracción permitió obtener una estimación global de la biomasa total del fitoplancton, mientras que mediante las mediciones con fluorescencia *in vivo* es posible estimar la clorofila *a* correspondiente a cianobacterias, aunque con las limitaciones propias de la fluorimetría cuando se quiere cuantificar concentraciones altas del pigmento o muestras con alta turbidez (Cremella et al., 2018). De todas formas, el indicador no brinda detalles de la composición de nuestra comunidad ni el comportamiento por especie.

Actualmente, la mayoría de los experimentos realizados con aplicación de  $\text{FeCl}_3$  (u otros floculantes similares) no analizan en detalle los cambios fitoplanctónicos relativos en términos de biovolumen específicos de cada especie (Miranda et al., 2017). Solo un trabajo, mostró cambios específicos en los recuentos celulares de poblaciones de cianobacterias tras la aplicación de sulfato férrico (Le et al., 2021). Lo más habitual es que, las evaluaciones del fitoplancton con agregados de floculantes se cuantifiquen en términos de dominancia de cianobacterias por clorofila *a* y conteo de cianobacterias (Miranda et al., 2017). Otra opción, es la comparación del biovolumen de los principales grupos taxonómicos de fitoplancton (Zhang et al., 2001) o cambios en especies individuales o cepas aisladas en cultivos (Araújo et al., 2018; Chow et al., 1998; Lürling & van Oosterhout, 2013), o una especie dentro de grupos de fitoplancton (Lelková et al., 2008; Lürling & Faassen, 2012; Ma et al., 2015). Por esto, se destaca la importancia de lo expuesto en este trabajo, en el cual se evaluó el crecimiento a nivel general y el análisis del comportamiento de la comunidad de fitoplancton, mediante la densidad óptica, la fluorescencia, la clorofila *a* por extracción y la cuantificación al microscopio y estimación del biovolumen específico.

Los efectos en el crecimiento del fitoplancton no son claros para el rango de concentraciones en las que se realizó el presente experimento, por lo que se recomienda evaluar los efectos que tendrían mayores relaciones de Fe:P. Sumado a esto, y dada la gran cantidad de variables que pueden favorecer o disminuir el crecimiento del fitoplancton, se sugiere realizar una prueba (como la propuesta en este trabajo), previo a una aplicación de  $\text{FeCl}_3$  en cuerpos de agua como tratamiento frente a la presencia de floraciones de cianobacterias. Este trabajo muestra que es necesario conocer la comunidad de fitoplancton y cianobacterias presentes en el cuerpo de agua previo a una posible aplicación de  $\text{FeCl}_3$  e identificar cómo se comportan estas en el transcurso del tiempo, ya que el agregado de Fe podría aumentar el crecimiento de algunas especies y así favorecer una floración de cianobacterias tóxicas y colonizadoras.

## 7 Conclusiones

En el presente trabajo se confirmó la precipitación del fósforo total y el fósforo disponible en los tratamientos que poseen mayor agregado de  $\text{FeCl}_3$ . Por lo tanto, se puede afirmar que una alta concentración de hierro provoca la limitación de este nutriente, y de esta manera, podría limitar el crecimiento del fitoplancton.

A nivel general, tomando como referencia los resultados obtenidos por clorofila *a* por extracción, se observó limitación en el crecimiento de fitoplancton para los tratamientos con mayor agregado de Fe. Sin embargo, los resultados de la biomasa fitoplanctónica obtenida por biovolumen, no mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

En todas las muestras se determinó la dominancia de cianobacterias. A medida que se modifica la concentración de Fe, se identificaron diferencias en la composición taxonómica de la comunidad. En los casos de bajo nivel de Fe (y condición inicial), se determinó la dominancia de *Aphanizomenom* sp. Para altos niveles de Fe, se observó codominancia de diferentes especies que prácticamente estaban ausentes en las muestras obtenidas del lago. Por lo tanto, los efectos no son claros para la disminución del crecimiento de cianobacterias, sugerimos evaluar rangos mayores de hierro. De todas maneras, es necesario realizar ensayos previos a la aplicación, ya que algunas cianobacterias pueden aumentar su crecimiento con el agregado de Fe.

Nuestros resultados resaltan el doble papel de las aplicaciones de Fe (en forma de  $\text{FeCl}_3$ ), es decir, puede servir como un controlador eficaz de la eutrofización y la proliferación de cianobacterias, pero al mismo tiempo es un nutriente esencial en el crecimiento de estas, tal como se observó para el caso de *Cuspidothrix* sp. y *Raphidiopsis raciborskii*. Estas especies son capaces de superar altas concentraciones de Fe y bajas concentraciones de P, y de esta manera, dominar en las condiciones alcanzadas.

## 8 Agradecimientos

A mis tutores Luis y Andrea, por todas sus enseñanzas, paciencia y el tiempo dedicado durante toda la pasantía.

A la Sección Limnología de la Facultad de Ciencias.

A mi pareja, que me acompañó en este proceso.

A mi familia y amigos.

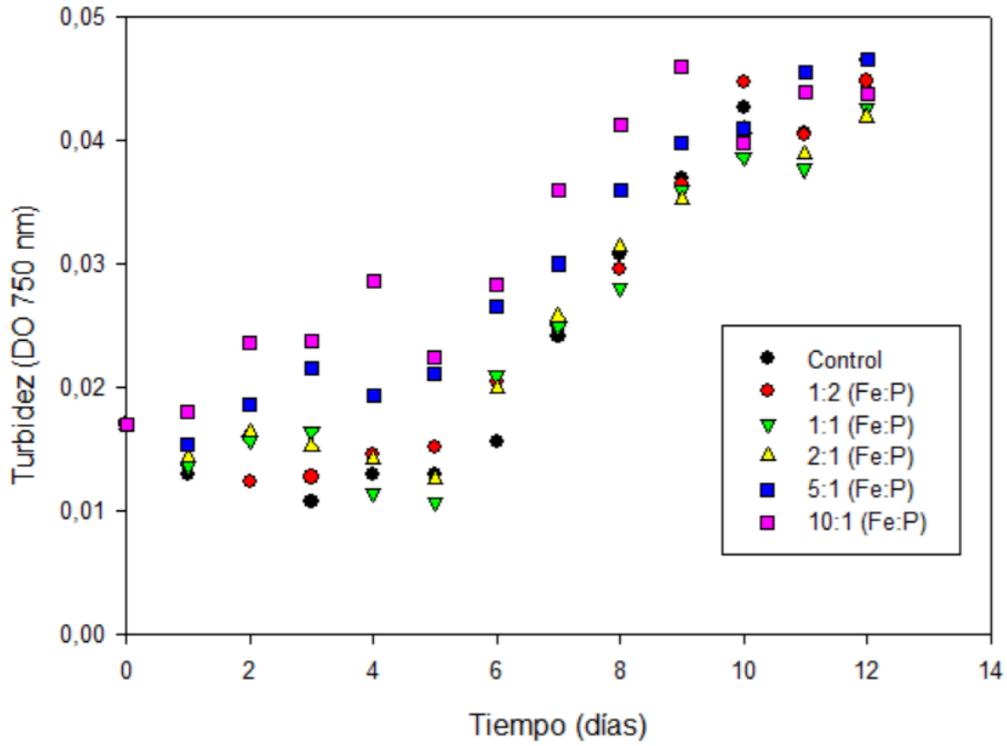
Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto ANII-Alianzas ALI\_1\_2017\_1\_137101.

## 9 Anexo

### 9.1 Anexo 1

**Tabla 1A.** Valor medio y desvío estándar de pH por tratamiento en los días de experimento 3, 6, 10 y 14.

Muestra	Día 3	día 6	día 10	día 14
Control	8,93 ± 0,02	9,41 ± 0,04	10,60 ± 0,13	11,36 ± 0,01
1:2 (Fe:P)	8,92 ± 0,01	9,49 ± 0,05	10,59 ± 0,07	11,33 ± 0,06
1:1 (Fe:P)	8,93 ± 0,02	9,40 ± 0,08	10,44 ± 0,26	11,37 ± 0,10
2:1 (Fe:P)	8,84 ± 0,03	9,42 ± 0,08	10,48 ± 0,40	11,24 ± 0,27
5:1 (Fe:P)	8,61 ± 0,07	9,21 ± 0,07	10,32 ± 0,32	11,32 ± 0,16
10:1 (Fe:P)	8,25 ± 0,03	8,85 ± 0,18	9,98 ± 0,31	11,12 ± 0,15



**Figura 1A.** Variación de la Turbidez (DO, densidad óptica a 750 nm) como indicador de biomasa en función del tiempo (días). Cada color representa una relación Fe:P ( $x \pm sd$ ;  $n=3$ ).



**Figura 2A.** Fotografía del punto de muestreo en el Lago Javier.



**Figura 3A.** Imágenes del experimento, a la izquierda el día 3 y a la derecha el día 10.

## 9.2 Anexo 2

**Método de salicilato de sodio (nitrato):** Tomar 25 mL de muestra filtrada por GF/C y agregar 1 mL de solución de salicilato de sodio. Preparar un blanco de reactivo con agua mili-Q. Luego evaporar a  $< 110\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Al residuo aún caliente, agregar 1 mL de ácido sulfúrico ppa y agitar hasta disolver. Agregar menos de 50 mL de agua mili-Q y completar la disolución. Luego, adicionar 7 mL de solución de tartrato de sodio y potasio. Completar hasta 100 mL de agua mili-Q y agitar hasta homogeneizar. Por último, medir la absorbancia en espectrofotómetro a 420 nm.

**Método de azul de indofenol:** Agregar 0,6 mL de solución A (fenol) a 10 mL de agua filtrada por GF/C y agitar. Luego agregar 0,6 mL de solución B (hipoclorito de sodio) y agitar. Guardar la muestra en oscuridad por 1 hora. El color es estable hasta por 24 horas. Por último, medir la absorbancia a 630 nm.

**Método de molibdato de amonio:** Tomar 10 mL de muestra filtrada por GF/C. Preparar un blanco de reacción con agua mili-Q. Agregar 1mL de reactivo mixto (Molibdato de Amonio, Ácido sulfúrico, ácido ascórbico y tartrato de antimonio y potasio) y agitar. Luego de 30 minutos medir la absorbancia en espectrofotómetro a 885 nm.

**Modelo de Cremella et al. (2018):** Este modelo permite obtener una estimación de la clorofila a total y de cianobacterias a partir de la medida de fluorescencia con un fluorómetro Turner Aquafluor. A continuación, se detalla la ecuación utilizada:

$$[\text{Chl } a]_Y^{\text{vivo}} = A F_{\text{PC}}^{**t} + B F_{\text{Chl } a}^{**t} - C a_{440} - D_i \text{NT}$$

Donde Chl a es la clorofila a in vivo total o de cianobacterias (dependiendo de los parámetros que se incluyen en la ecuación, Tabla 3 Cremella et al. (2018)). A y B son los parámetros de las regresiones múltiples, Fpc y F Chl a con la fluorescencia medida y normalizada, C es un coeficiente de corrección de absorbancia a 440 nm, NT es la turbidez y Di es un factor de corrección para turbidez.

## 10 Referencias Bibliográficas

- Addison, E. L., Gerlach, K. T., Spellman, C. D., Santilli, G., Fairbrother, A. R., Shepard, Z., Dudle, J. D., & Goodwill, J. E. (2021). Physicochemical implications of cyanobacteria oxidation with Fe(VI). *Chemosphere*, *266*, 128956. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128956>
- Aguilera, A., Aubriot, L., Echenique, R. O., Salerno, G. L., Brena, B. M., Pérez, M., & Bonilla, S. (2017). Synergistic effects of nutrients and light favor Nostocales over non-heterocystous cyanobacteria. *Hydrobiologia*, *794*(1), 241-255. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3099-1>
- Alcántara, I., Piccini, C., Segura, A. M., Deus, S., González, C., Martínez de la Escalera, G., & Kruk, C. (2018). Improved biovolume estimation of *Microcystis aeruginosa* colonies: A statistical approach. *Journal of Microbiological Methods*, *151*, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.05.021>
- 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>
- Araújo, F., van Oosterhout, F., Becker, V., Attayde, J. L., & Lürling, M. (2018). Effects of polyaluminum chloride and lanthanum-modified bentonite on the growth rates of three *Cylindrospermopsis raciborskii* strains. *PloS One*, *13*(4), e0195359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195359>

- Aubriot, L. (2019). Nitrogen availability facilitates phosphorus acquisition by bloom-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(2).  
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiy229>
- Aubriot, L., Bonilla, S., & Falkner, G. (2011). Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01078.x>
- Bakker, E. S., Van Donk, E., & Immers, A. K. (2016). Lake restoration by in-lake iron addition: A synopsis of iron impact on aquatic organisms and shallow lake ecosystems. *Aquatic Ecology*, 50(1), 121-135. <https://doi.org/10.1007/s10452-015-9552-1>
- 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. En L. Van Liere & R. D. Gulati (Eds.), *Restoration and Recovery of Shallow Eutrophic Lake Ecosystems in The Netherlands* (pp. 211-212). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2432-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2432-4_19)
- Bonilla, S. (2009). *Cianobacterias planctónicas de Uruguay*. UNESCO.
- Bonilla, S. (2015). Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *INNOTEC*, 10. <https://doi.org/10.26461/10.01>
- Bonilla, S., Aguilera, A., Aubriot, L., Huszar, V., Almanza, V., Haakonsson, S., Izaguirre, I., O'Farrell, I., Salazar, A., Becker, V., Cremella, B., Ferragut, C., Hernandez, E., Palacio, H., Rodrigues, L. C., Sampaio da Silva, L. H., Santana, L. M., Santos, J., Somma, A., ... Antoniades, D. (2023). Nutrients and not temperature are the key drivers for cyanobacterial biomass in the Americas. *Harmful Algae*, 121, 102367. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2022.102367>

- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M. C. S., González-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V. L. M., Lüring, M., Antoniadis, D., Padisák, 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., & O'Farrell, I. (2023). La importancia de usar el biovolumen en estudios de fitoplancton y monitoreo ambiental de cianobacterias. *Ecología Austral*, *33*(2), 558-566. <https://doi.org/10.25260/EA.23.33.2.0.2148>
- 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)
- Briand, J., Leboulanger, C., Humbert, J., Bernard, C., & Dufour, P. (2004). *CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII* (CYANOBACTERIA) INVASION AT MID-LATITUDES: SELECTION, WIDE PHYSIOLOGICAL TOLERANCE, ORGLOBALWARMING? <sup>1</sup>. *Journal of Phycology*, *40*(2), 231-238. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03118.x>
- Chorus, I., & Bartram, J. (Eds.). (1999). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring, and management*. E & FN Spon.
- Chorus, I., & Welker, M. (Eds.). (2021). *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management* (Second edition). CRC Press / Taylor & Francis Group.

- 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)
- Cremella, B., Huot, 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>
- Deppe, T., & Benndorf, J. (2002). Phosphorus reduction in a shallow hypereutrophic reservoir by in-lake dosage of ferrous iron. *Water Research*, 36(18), 4525-4534. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00193-8](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00193-8)
- Dolman, A. M., Rücker, J., Pick, F. R., Fastner, J., Rohlack, T., Mischke, U., & Wiedner, C. (2012). Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. *PLoS ONE*, 7(6), e38757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038757>
- F. Galvanese, E., 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>
- Fabre, A., Carballo, C., Hernández, E., Piriz, P., Bergamino, L., Mello, L., González, S., Pérez, G., León, J. G., Aubriot, L., Bonilla, S., & Kruk, C. (2010). *El nitrógeno y la relación zona eufótica/zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales, artificiales de Uruguay.*

- Falkner, G., Falkner, R., & Schwab, A. J. (1989). Bioenergetic characterization of transient state phosphate uptake by the cyanobacterium *Anacystis nidulans*: Theoretical and experimental basis for a sensory mechanism adapting to varying environmental phosphate levels. *Archives of Microbiology*, 152(4), 353-361. <https://doi.org/10.1007/BF00425173>
- Frías, J. E., Flores, E., & Herrero, A. (1994). Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Molecular Microbiology*, 14(4), 823-832. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01318.x>
- 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(2), 929-933. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.2.0929>
- Golterman, H. L. (2001). [No title found]. *Hydrobiologia*, 450(1/3), 99-106. <https://doi.org/10.1023/A:1017559903404>
- Graham, L. E., Graham, J. M., & Wilcox, L. W. (2009). *Algae* (2. ed). Benjamin Cummings.
- 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. *The Science of the Total Environment*, 609, 1132-1139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.067>
- Hillebrand, H., Dürselen, C., 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>

- Huisman, J., Codd, G. A., Paerl, H. W., Ibelings, B. W., Verspagen, J. M. H., & Visser, P. M. (2018). Cyanobacterial blooms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(8), 471-483. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>
- ISO 10260. (1992). *Water Quality. Measurement of Biochemical Parameters. Spectrometric Determination of the Chlorophyll-a Concentration. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.*
- 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>
- Jančula, D., & Maršálek, B. (2011). Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere*, 85(9), 1415-1422. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.036>
- Jiang, J.-Q., Graham, N. J. D., & Harward, C. (1993). Comparison of Polyferric Sulphate with Other Coagulants for the Removal of Algae and Algae-Derived Organic Matter. *Water Science and Technology*, 27(11), 221-230. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0280>
- 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>
- 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>

- Koroleff, F. (1970). *Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue*, *Int. Con. Explor. Sea, C. M.* 1969/C:9.
- 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. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy046>
- Le, K. T. N., Goitom, E., Trigui, H., Sauv e, S., Pr evost, M., & Dorner, S. (2021). The Effects of Ferric Sulfate ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) on the Removal of Cyanobacteria and Cyanotoxins: A Mesocosm Experiment. *Toxins*, 13(11), 753. <https://doi.org/10.3390/toxins13110753>
- Lelkova, E., Rulık, M., Hekera, P., Dobias, P., Dolejs, P., Borovickova, M., & Poulıckova, A. (2008). The influence of the coagulant PAX-18 on *Planktothrix agardhii* bloom in a shallow eutrophic fishpond. *Fottea*, 8(2), 147-154. <https://doi.org/10.5507/fot.2008.013>
- Luriling, M., & Faassen, E. J. (2012). Controlling toxic cyanobacteria: Effects of dredging and phosphorus-binding clay on cyanobacteria and microcystins. *Water Research*, 46(5), 1447-1459. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.008>
- Luriling, M., & van Oosterhout, F. (2013). Controlling eutrophication by combined bloom precipitation and sediment phosphorus inactivation. *Water Research*, 47(17), 6527-6537. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.019>
- Ma, X., Wang, Y., Feng, S., & Wang, S. (2015). Comparison of four flocculants for removing algae in Dianchi Lake. *Environmental Earth Sciences*, 74(5), 3795-3804. <https://doi.org/10.1007/s12665-015-4093-4>

- Miranda, M., Noyma, N., Pacheco, F. S., de Magalhães, L., Pinto, E., Santos, S., Soares, M. F. A., Huszar, V. L., Lüring, M., & Marinho, M. M. (2017). The efficiency of combined coagulant and ballast to remove harmful cyanobacterial blooms in a tropical shallow system. *Harmful Algae*, 65, 27-39. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.04.007>
- Müller, R., & Wiedemann, O. (1955). *Die bestimmung des nitrat-ions in Wasser. Von Wasser* 22, 247pp.
- Murphy, J., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Oliver, R. L., Hamilton, D. P., Brookes, J. D., & Ganf, G. G. (2012). Physiology, Blooms and Prediction of Planktonic Cyanobacteria. En B. A. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 155-194). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_6)
- Paerl, H. W., Scott, J. T., McCarthy, M. J., Newell, S. E., Gardner, W. S., Havens, K. E., Hoffman, D. K., Wilhelm, S. W., & Wurtsbaugh, W. A. (2016). It Takes Two to Tango: When and Where Dual Nutrient (N & P) Reductions Are Needed to Protect Lakes and Downstream Ecosystems. *Environmental Science & Technology*, 50(20), 10805-10813. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02575>
- Raven, J. A., Evans, M. C. W., & Korb, R. E. (1999). [No title found]. *Photosynthesis Research*, 60(2/3), 111-150. <https://doi.org/10.1023/A:1006282714942>
- Reynolds, C. S. (2006). *The Ecology of Phytoplankton* (1.<sup>a</sup> ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542145>

- 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>
- Schindler, D. W. (1977). Evolution of phosphorus limitation in lakes. *Science (New York, N.Y.)*, 195(4275), 260-262. <https://doi.org/10.1126/science.195.4275.260>
- 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*, 109(45). <https://doi.org/10.1073/pnas.1216012109>
- Somma, A. (2014). *El papel de la luz y la temperatura en la dinámica de cianobacterias en un lago de uso recreativo*.
- Sournia, A. (1978). *Phytoplankton Manual, UNESCO, Paris*.
- Whitton, B. A. (Ed.). (2012). *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
- Wolk, C. P., Ernst, A., & Elhai, J. (1994). Heterocyst Metabolism and Development. En D. A. Bryant (Ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (pp. 769-823). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0227-8\\_27](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0227-8_27)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0269-7491(88)90209-6)

Zhang, Y., Ghadouani, A., Prepas, E. E., Pinel-Alloul, B., Reedyk, S., Chambers, P. A., Robarts, R. D., Méthot, G., Raik, A., & Holst, M. (2001). Response of plankton communities to whole-lake  $\text{Ca(OH)}_2$  and  $\text{CaCO}_3$  additions in eutrophic hardwater lakes. *Freshwater Biology*, 46(8), 1105-1119. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00793.x>