



Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Embalses como incubadoras de cianobacterias: efecto de la residencia del agua y de la disponibilidad de nutrientes

Tesina de la Licenciatura en Ciencias Biológicas
Opción Ecología

Mariana Illarze

Orientadora: Dra. Sylvia Bonilla
Sección Limnología, IECA, Facultad de Ciencias

Coorientador: Dr. Luis Aubriot
Sección Limnología, IECA, Facultad de Ciencias

Octubre 2015

Montevideo, Uruguay

Índice

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Resumen..... | 4 |
| 2 | Introducción | 5 |
| | 2.1 Calidad de agua y floraciones de cianobacterias | 5 |
| | 2.2 Factores reguladores de las floraciones de cianobacterias..... | 6 |
| | 2.3 Situación en Uruguay respecto a las floraciones de cianobacterias. Embalses del Río Negro como caso de estudio..... | 7 |
| | 2.4 Justificación | 8 |
| 3 | Objetivo | 9 |
| | 3.1 Objetivos específicos | 9 |
| 4 | Hipótesis y Predicciones | 9 |
| | 4.1 Predicciones | 10 |
| 5 | Materiales y métodos..... | 11 |
| | 5.1 Datos de campo del Río Negro..... | 11 |
| | 5.2 Experimento..... | 12 |
| | 5.2.1 Obtención de muestras del embalse Palmar | 12 |
| | 5.2.2 Diseño experimental | 13 |
| | 5.2.3 Indicadores de respuesta..... | 15 |
| | 5.2.4 Análisis de datos..... | 16 |
| 6 | Resultados..... | 17 |
| | 6.1 Datos de campo del Río Negro..... | 17 |
| | 6.2 Experimento..... | 21 |
| | 6.2.1 Indicadores cuantitativos (clorofila por extracción y pigmentos <i>in vivo</i>) | 21 |
| | 6.2.2 Composición fitoplanctónica | 24 |
| | 6.2.3 Microcistinas totales..... | 27 |
| 7 | Discusión | 28 |
| | 7.1 Potencial riesgo para la salud humana del agua del Río Negro, según indicadores cuantitativos de cianobacterias..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 7.2 Toxicidad de la muestra del Río Negro | 29 |
| 7.3 El Tiempo de residencia del agua como variable explicativa del desarrollo del fitoplancton | 30 |
| 7.4 Dominancia de cianobacterias coloniales en tiempos de residencia mayores | 31 |
| 7.5 Cambios de la comunidad fitoplanctónica según el tratamiento | 32 |
| 8 Conclusiones..... | 35 |
| 9 Agradecimientos..... | 36 |
| 10 Referencias bibliográficas | 37 |

1 Resumen

El aumento del aporte de nutrientes y las modificaciones del régimen hidrológico del agua son factores que regulan el desarrollo de floraciones de cianobacterias. El Río Negro es uno de los ecosistemas lóticos más importantes del país, presenta condiciones de eutrofia y cuenta con tres embalses en cadena en los cuales se registran frecuentemente floraciones acumulativas de cianobacterias tóxicas. El objetivo del estudio fue determinar la influencia del tiempo de residencia del agua y de los nutrientes como factores reguladores de la formación de floraciones en dichos embalses. Se trabajó con una aproximación complementaria en dos etapas. En la primera se analizaron datos de la composición del fitoplancton y variables limnológicas a lo largo de 15 estaciones del Río Negro. En una segunda etapa, se realizó un experimento en microcosmos con muestras naturales del Río Negro durante 10 días, en el cual se combinaron dos factores: *con* y *sin* dilución y *con* y *sin* agregado de nutrientes. Se evaluó la respuesta general del fitoplancton a través de distintos indicadores de biomasa (fluorescencia de clorofila *a* y ficocianina, y concentración de clorofila *a*), se caracterizó la composición de la comunidad y se determinó la concentración de microcistinas totales. Según el conjunto de las variables fisicoquímicas, los sitios de muestreo del río se agruparon en tres zonas: aguas arriba, aguas abajo y embalses más sitios entre embalses. En los embalses del Río Negro, con mayores tiempos de residencia que las zonas de río, se observó un aumento de la biomasa de fitoplancton, especialmente de cianobacterias, las cuales también fueron reportadas aguas abajo. Los resultados del experimento indicaron que el tratamiento con mayor tiempo de residencia del agua y elevada concentración de nutrientes favoreció el crecimiento del fitoplancton. Grandes colonias de cianobacterias fueron dominantes y se registró la mayor concentración de microcistina con relación a los otros tratamientos. No obstante, el fitoplancton de menor talla tuvo un mayor crecimiento relativo en el tratamiento con dilución, lo que sugiere que cambios en el tiempo de residencia pueden afectar la biomasa, así como la estructura de la comunidad fitoplanctónica. Se pudo comprobar para el Río Negro que el aumento de la carga de nutrientes y del tiempo de residencia del agua generan condiciones favorables para el desarrollo de floraciones de cianobacterias. Estos resultados advierten sobre la necesidad de considerar la sinergia entre ambos factores a la hora de predecir la aparición de floraciones de cianobacterias en ecosistemas lóticos.

2 Introducción

2.1 Calidad de agua y floraciones de cianobacterias

En las últimas décadas, las diversas actividades antrópicas y el cambio climático han modificado el estado trófico de muchos cuerpos de agua, lo que ha resultado en la eutrofización de estos (Kalf 2002). Uno de los principales efectos de la eutrofización es el aumento abrupto de la biomasa de fitoplancton (algas eucariotas y cianobacterias), proceso denominado *floración*. Este fenómeno deteriora la calidad de agua y provoca la pérdida gradual de la biodiversidad del sistema, hecho que limita el uso sustentable del recurso y su conservación (Lampert & Sommer 2007). Las floraciones de fitoplancton pueden generarse y permanecer por periodos de tiempo variable, y suelen estar formadas por una o pocas especies, principalmente de cianobacterias (Reynolds 2006).

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos procariotas fotosintetizadores aeróbicos, que se encuentran ampliamente distribuidos en todo el planeta (Graham & Wilcox 2000). Este grupo presenta una gran variedad de rasgos eco-fisiológicos que les permiten colonizar diferentes ecosistemas (Reynolds 1984). Por ejemplo, poseen pigmentos accesorios de la fotosíntesis (ficobilinas) que les permiten crecer en un amplio gradiente de intensidad lumínica (Whitton & Potts 2012). Asimismo, muchas de las especies planctónicas que forman floraciones tienen la capacidad de regular su posición en la columna de agua a través de la producción de vesículas de gas. Esto les permite aumentar su exposición a la luz y acceder a fuentes de nitrógeno inorgánico en el hipolimnion (Reynolds 2006; Whitton & Potts 2012). Las cianobacterias son más eficientes que las algas en lo que respecta a la captura de nutrientes cuando estos están en muy bajas concentraciones (Aubriot *et al.* 2011) y muchas especies tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N₂) cuando hay poco nitrógeno inorgánico disuelto en la columna de agua (Ferber *et al.* 2004). Otra característica que poseen muchas cianobacterias, a diferencia de las algas eucariotas, es la capacidad de producir cianotoxinas (Huisman *et al.* 2005; Reynolds 2006; Whitton & Potts 2012).

Las cianotoxinas pueden ser de diversos tipos según sus efectos sean hepatotóxicos, neurotóxicos o dermatotóxicos y algunas de ellas pueden perdurar por largos periodos en los cuerpos de agua (Codd *et al.* 2005). En floraciones de cianobacterias de agua dulce la cianotoxina que se encuentra con mayor frecuencia a nivel mundial es la hepatoxina microcistina. Esta es producida por varios géneros de cianobacterias, entre

las cuales predominan las del género *Microcystis* (Bonilla 2009). Aún es poco clara la función que cumplen las cianotoxinas: han sido asociadas a diversos mecanismos que incluso, a veces, son antagónicos (Jang *et al.* 2003; Briand *et al.* 2004; Babica *et al.* 2006). Las cianotoxinas plantean un reto importante para los procesos de producción de agua potable, tornándolos más complejos y por lo tanto más costosos. Asimismo, aparecen consecuencias negativas para el resto de la biota y otros usos del agua (Whitton & Potts 2012).

Debido al riesgo sanitario que representan las floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS 1998) ha desarrollado Niveles Guía para evaluar el estado de los ecosistemas acuáticos asociados al riesgo para la salud humana (Tabla 1). Estos niveles se determinaron a partir de diferentes indicadores como la concentración de clorofila *a*, el biovolumen de cianobacterias, y la concentración de microcistina-LR. Dependiendo del Nivel Guía se predicen las consecuencias adversas sobre la salud humana y por lo tanto se recomienda la toma de determinadas medidas según el uso del cuerpo de agua, así como la implementación de una secuencia de acciones de manejo (Chorus & Bartram 1999).

Tabla 1- Niveles Guía establecidas por la OMS para ecosistemas acuáticos con fines recreacionales, según concentración de clorofila *a* (Clo *a*), biovolumen de cianobacterias (BV ciano), y concentración de la toxina microcistina-LR asociada a la cantidad de clorofila *a* (Chorus & Bartram 1999).

| Nivel Guía | Clo <i>a</i> (μgL^{-1}) | BV ciano (mm^3L^{-1}) | microcistina-LR (μgL^{-1}) |
|------------|---|--|--|
| 1 | 10 | 2 | |
| 2 | 50 | 10 | 20 |

2.2 Factores reguladores de las floraciones de cianobacterias

Los factores que desencadenan el desarrollo de floraciones de cianobacterias son diversos y sus interacciones complejas, por lo que han sido objeto de numerosos estudios (Huisman *et al.* 2005; Whitton & Potts 2012). Una de las principales variables que afecta, y por tanto, controla el crecimiento del fitoplancton es la concentración de nutrientes. La limitación por nutrientes es frecuentemente considerada la causa de un crecimiento reducido en ambientes naturales y un importante impulsor de la competencia que determina la composición de la comunidad fitoplanctónica (Reynolds 2006). Los requerimientos celulares de nutrientes se asocian a la composición estequiométrica de la biomasa de plancton de 106C:16N:1P (Relación de Redfield), siendo esta relación un buen *proxy* del estado nutricional del plancton en el sistema acuático (Lampert & Sommer 2007). La disponibilidad de carbono es, en general,

suficiente, por lo tanto el crecimiento de las cianobacterias suele estar limitado por nitrógeno o por fósforo.

El crecimiento del fitoplancton está regulado principalmente por la disponibilidad de recursos (nutrientes y luz), temperatura y depredación. Sin embargo, en sistemas lóticos la hidrología juega un papel fundamental. El alto flujo hídrico puede significar un proceso de pérdida de fitoplancton de un cuerpo de agua. Cuando el tiempo de residencia del agua es menor que la tasa de crecimiento de cierto organismo, este se ve limitado en su crecimiento y hasta puede desaparecer del sistema (Straskraba 1999). Estudios sobre modelos hidrológicos han evidenciado la importancia de la velocidad del flujo del agua en la formación de floraciones y han encontrado que estas se producen con una mayor frecuencia en las zonas de embalses en comparación con las de río (Padisák *et al.* 1999; Soares *et al.* 2008; Leigh *et al.* 2010), así como en áreas de alto tiempo de residencia del agua (Michalak *et al.* 2013). En la mayoría de los ríos el tiempo de residencia del agua puede variar de horas a pocos días, dependiendo de las condiciones hidrológicas, y en sistemas lénticos se ha descrito un promedio de 17 años (Kalff 2002). Los embalses sobre ríos son ecosistemas artificiales en donde se altera el tiempo de residencia del agua hasta dos o tres órdenes de magnitud más (días, meses, años) (Tundisi *et al.* 1999). En la actualidad son miles los ríos en los cuales se han construido embalses para diversos fines, todos asociados al desarrollo de las sociedades humanas. La construcción de un embalse sobre un río ocasiona muchos cambios en la cuenca y en el sistema (Tundisi *et al.* 1999)

2.3 Situación en Uruguay respecto a las floraciones de cianobacterias. Embalses del Río Negro como caso de estudio

En Uruguay, se han registrado floraciones de cianobacterias desde 1982 en diversos ecosistemas eutróficos, principalmente en verano (ver recopilación en Bonilla 2009). En la actualidad, al igual que en la mayoría de los países, es un fenómeno frecuente en muchos cuerpos de agua continentales. Las floraciones de organismos potencialmente tóxicos, como las del género *Microcystis*, son frecuentes en lagos someros, costa del Río de la Plata (De León & Yunes 2001; Pírez *et al.* 2013) y en embalses, como los del Río Negro, donde se han detectado elevadas concentraciones de la cianotoxina microcistina (De León 2000; González-Piana *et al.* 2011; Chalar *et al.* 2014).

El Río Negro es uno de los ecosistemas lóticos más grandes del país, con una cuenca en territorio uruguayo de 38.000 km² (Fig. 1). El uso predominante de los suelos de su

cuenca es la ganadería extensiva sobre pradera con mejoras, seguido de actividades agrícolas y forestales (MGAP 2012). Sobre su curso principal se han construido tres grandes embalses en cadena destinados a la generación de energía eléctrica: Bonete (año: 1945), Baygorria (año: 1960) y Palmar (año: 1982). Los embalses han sido clasificados como eutróficos según la concentración de fósforo total y de la biomasa de fitoplancton registrada en algunos veranos (Chalar *et al.* 2011, 2012 y 2014; DINAMA 2011). Estas condiciones favorecen el desarrollo de floraciones de cianobacterias tóxicas. Los usos que el ser humano hace de este cuerpo de agua son múltiples (abastecimiento de agua para potabilización, riego, abrevaje de ganado, actividades pesqueras y recreación) por lo que cobra especial importancia la aparición de floraciones de cianobacterias tóxicas.

Tabla 2- Ubicación y características hidrológicas de los embalses del Río Negro (tomado de Chalar *et al.* 2014). En sentido aguas arriba-aguas abajo: Rincón del Bonete, Baygorria y Palmar. *: Promedios históricos.

| | Bonete | Baygorria | Palmar |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Ubicación | 32°49'S - 56°25'W | 32°53'S - 56°48'W | 33°03'S - 57°27'W |
| Área de la cuenca (km ²) | 39541 | 42000 | 62411 |
| Superficie (km ²) | 1070 | 100 | 320 |
| Volumen (km ³) | 8.8 | 0.57 | 2.86 |
| Profundidad máx. (m) | 32 | 20 | 15 |
| Tiempo de residencia (días)* | 150 | 3 | 16 |

2.4 Justificación

El presente proyecto de investigación propone realizar un análisis de variables limnológicas e indicadores de biomasa de fitoplancton a lo largo del Río Negro. Los datos se obtuvieron de los proyectos en ejecución liderados por la Dra. Bonilla (ANII 6384 y Convenio DINAMA-Facultad de Ciencias-Cianobacterias). Asimismo, se proponen experimentos que serán pioneros ya que buscarán determinar la causalidad de la interacción de los nutrientes claves y las variaciones en el tiempo de residencia del agua con el crecimiento y toxicidad de las poblaciones de cianobacterias de los embalses del Río Negro. La información obtenida de los experimentos propuestos será novedosa al contar con diversos indicadores biológicos de las cianobacterias en relación a la concentración de toxinas. El estudio se enmarca en una de las principales líneas de investigación de la Sección Limnología (Ecología de fitoplancton y cianobacterias) y de los trabajos del grupo de investigación CSIC 1176. Este trabajo resulta de interés para comprender la dinámica de las floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas y así poder predecir su ocurrencia. El conocimiento generado

podrá aportar información relevante para una correcta gestión de los ríos del país, principalmente del Río Negro, de especial importancia, ya que son múltiples los usos y beneficios que se obtienen de este ecosistema.

3 Objetivo

Determinar la influencia de la hidrología y de los nutrientes en la regulación de la biomasa de cianobacterias potencialmente tóxicas en el Río Negro.

3.1 Objetivos específicos

1. Evaluar si los cambios en la composición de la comunidad de fitoplancton del gradiente longitudinal del Río Negro se asocian con el tiempo de residencia del agua, en tramos de río y tramos embalsados.
2. Determinar experimentalmente si el tiempo de residencia y la disponibilidad de nutrientes induce cambios en la biomasa de la comunidad natural de fitoplancton del Río Negro.
3. Evaluar si el tiempo de residencia y la disponibilidad de nutrientes afecta la contribución relativa al biovolumen total fitoplanctónico de dos fracciones de distinto tamaño.
4. Evaluar si el tiempo de residencia y la disponibilidad de nutrientes afecta la respuesta de las cianobacterias en cuanto a la cantidad de cianotoxinas producidas.

4 Hipótesis y Predicciones

Los factores tanto bióticos como abióticos que influyen en la formación de floraciones de cianobacterias son diversos y sus interacciones complejas. Determinados nutrientes y determinadas concentraciones de los mismos pueden favorecer a unos o a otros grupos de microorganismos del fitoplancton. El mayor tiempo de residencia del agua (por ejemplo, en embalses) genera un ambiente propicio para el incremento de la biomasa de cianobacterias de gran tamaño como las que comúnmente desarrollan floraciones. La **hipótesis** que se plantea propone que el crecimiento abrupto de la biomasa de cianobacterias en los embalses del Río Negro está principalmente regulado por la sinergia de los nutrientes y por el tiempo de residencia del agua.

4.1 Predicciones

1. El mayor tiempo de residencia del agua en combinación con mayor disponibilidad de nutrientes (fósforo y nitrógeno) favorece la dominancia de cianobacterias coloniales formadoras de floraciones.
2. El menor tiempo de residencia del agua favorece la mayor contribución relativa a la biomasa total de fitoplancton de las fracciones de la comunidad de tamaño menor a 10 μm .

5 Materiales y métodos

Se trabajó con dos aproximaciones complementarias:

En la primera parte se analizaron los datos de la comunidad fitoplanctónica a lo largo del Río Negro obtenidos durante la campaña de verano del año 2013 llevada a cabo en el marco del proyecto en ejecución en la Sección Limnología (Convenio DINAMA-Facultad de Ciencias-Cianobacterias). En una segunda etapa se llevó a cabo un experimento en microcosmos con muestras naturales de fitoplancton del Río Negro del embalse Palmar (2014).

5.1 Datos de campo del Río Negro

Se analizaron los datos de biovolumen fitoplanctónico asociado a 15 sitios de muestreo del Río Negro desde el sitio 1 (aguas arriba, punto inicial de muestreo) hasta el sitio 17 (aguas abajo, último punto previo a la desembocadura en el Río Uruguay) (Fig. 1), correspondiente a muestras obtenidas del 19 al 28 de febrero del 2013. Se compararon las zonas de embalses con los tramos de río en cuanto a clorofila *a*, biovolumen total (BV total) y biovolumen de cianobacterias (BV ciano). Se examinó la riqueza taxonómica a lo largo del gradiente longitudinal del río y su relación con el biovolumen de cianobacterias.

Asimismo, se realizó un Análisis de Correspondencia simple a través del cual se exploró la distribución en el espacio de los diferentes taxa de la comunidad fitoplanctónica del Río Negro en relación a los sitios de muestreo. Para este análisis fueron seleccionados aquellos taxa que contribuyeron, en al menos alguno de los sitios de muestreo, con $\geq 5\%$ del biovolumen total de cada estación.

Para la descripción de las variables abióticas del Río Negro, se llevó a cabo un Análisis de Agrupación Aglomerativa, Dendrograma de Disimilaridad (programa R 3.2.0, paquete: *vegan*) utilizando el método *Average Linkage* (criterio de mínima distancia de Gower), para lo cual se estandarizaron las diferentes variables ambientales. A partir del mismo se realizó un corte arbitrario que permitió definir 3 grupos de estaciones del total de los sitios muestreados del Río Negro, para los cuales se calcularon algunos de los estadísticos muestrales (media, desvío estándar, valor máximo y mínimo).

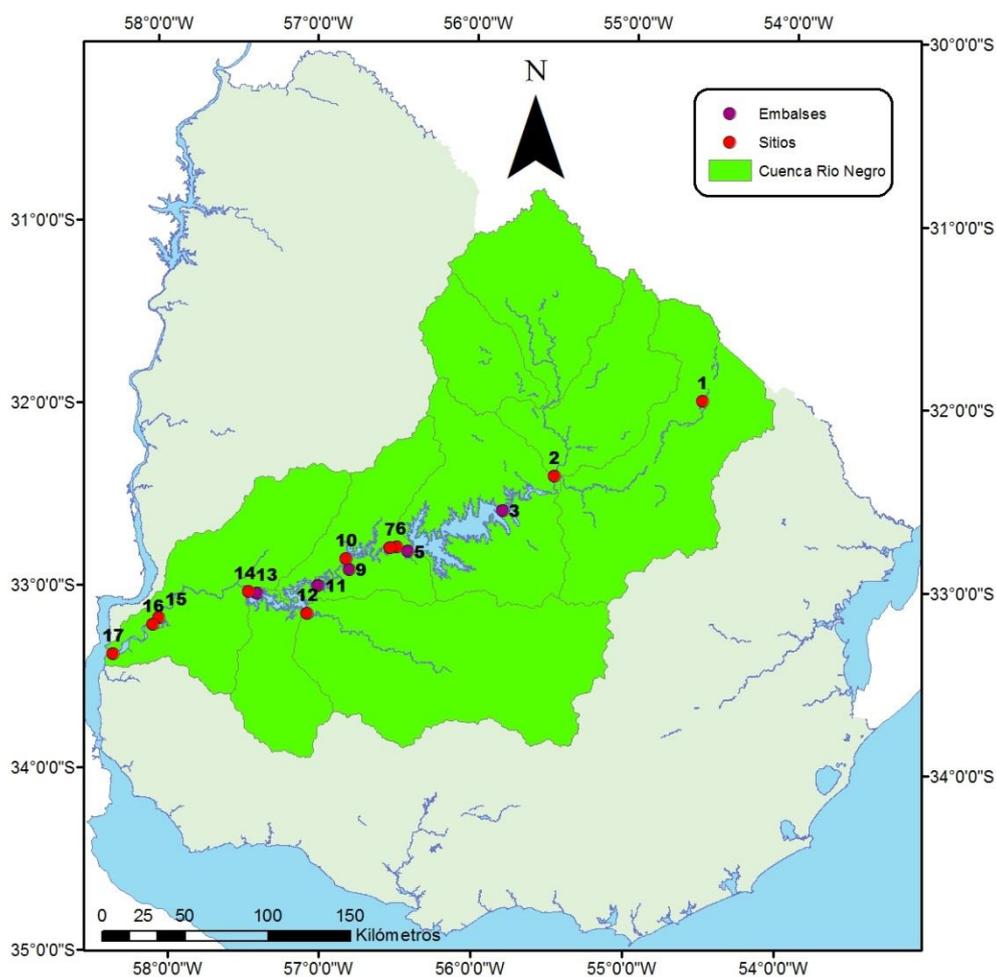


Figura 1- Mapa de Uruguay donde se detalla la Cuenca del Río Negro con la ubicación de los sitios de muestreos definidos en el Programa de Monitoreo del Río Negro de DINAMA. Los sitios remarcados con círculos violetas corresponden a las zonas de embalse. De derecha a izquierda (sentido de aguas arriba hacia aguas abajo): Embalse Rincón del Bonete (3 y 5), Embalse Baygorria (9) y Embalse Palmar (11 y 13). Mapa editado por Signe Haakonsson utilizando el software ArcGIS (2015).

5.2 Experimento

5.2.1 Obtención de muestras del embalse Palmar

El embalse Palmar (Tabla 2, Fig. 1) ha sido clasificado como eutrófico (Chalar *et al.* 2014). Según datos preliminares del proyecto ANII FCE 6384, se ha registrado un elevado biovolumen de cianobacterias (cercano al 80 % del biovolumen total de fitoplancton), a la vez que Gonzalez-Piana *et al.* (2011) han reportado la presencia de organismos tóxicos ($1478 \mu\text{gL}^{-1}$ de microcistina-LR en marzo del 2010). La muestra del embalse (estación RN11, cabecera del embalse) se obtuvo el 27/06/2014 obtenida de nivel sub-superficial y de aproximadamente 20 L (muestreado por Bruno Cremella). Se conservó en condiciones óptimas (oscuridad y baja temperatura) hasta ser

transportada al laboratorio en Montevideo donde se acondicionó para iniciar el experimento al día siguiente.

5.2.2 Diseño experimental

Se llevó a cabo un experimento piloto (datos no presentados) que permitió ajustar el dispositivo general del experimento a realizarse con las muestras del embalse Palmar, el volumen de muestra en cada unidad experimental, así como también la selección de variables a monitorear y su posterior análisis. También fue posible determinar el tiempo de respuesta de crecimiento del fitoplancton a las condiciones experimentales expuestas. El experimento piloto tuvo una duración de 10 días y se realizó en condiciones controladas en la sala de experimentación de PEDECIBA Biología.

El experimento final consistió en un diseño con arreglo factorial en el que se aplicaron 2 niveles de 2 factores, resultando en 4 tratamientos con 3 réplicas cada uno (Tabla 3). El primer factor fue *concentración de nutrientes*, con 2 niveles: *con* y *sin* agregado. El otro factor consistió en dos condiciones diferentes de *tiempo de residencia* del agua a través de diluciones con agua filtrada del río, resultando en 2 niveles: *con* (tiempo de residencia= 3.4 días) y *sin* dilución (tiempo de residencia= 10 días).

Tabla 3. Detalle de los 4 tratamientos del experimento. El nombre de cada tratamiento hace referencia a los niveles de ambos factores aplicados, C corresponde al Control (sin nutrientes y sin dilución).

| Tratamiento | Nutriente | Dilución |
|-------------|------------|------------|
| C | <i>sin</i> | <i>sin</i> |
| Dil | <i>sin</i> | <i>con</i> |
| NPxdil | <i>con</i> | <i>con</i> |
| NP | <i>con</i> | <i>sin</i> |

La muestra natural obtenida fue homogeneizada y, mediante manguera, se distribuyó en frascos de cultivo Schott de vidrio de 1 L de capacidad, previamente lavados y esterilizados. Cada frasco fue llenado con 600 mL de muestra hasta completar las 12 unidades experimentales (4 tratamientos con 3 réplicas cada uno). Luego los organismos se aclimataron por aproximadamente 40 horas a 25 ± 2 °C, $110 - 115 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (determinado con fotoradiómetro Li-Cor LI-250), fotoperíodo 16: 8 luz: oscuridad en la sala de experimentación de PEDECIBA Biología (Fig. 2). Pasado el tiempo de aclimatación se aplicaron los diferentes tratamientos seleccionando las botellas al azar.

Factor - Concentración de nutrientes:

A los tratamientos con el nivel *con* se adicionaron sales de Nitrato (NaNO_3) y Fosfato (K_2HPO_4) por ser los nutrientes que frecuentemente limitan el crecimiento del fitoplancton. Las concentraciones de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) adicionadas fueron seleccionadas de forma tal que generaran condiciones de saturación, asegurando condiciones de suficiencia por ambos nutrientes durante el período de incubación. La adición de nutrientes para los tratamientos correspondientes se efectuó en pulsos diarios, es decir que la concentración total a ser adicionada de ambas sales se dosificó en 9 pulsos de igual concentración utilizando pipetas automáticas con puntas esterilizadas (uno por cada día de experimento, con excepción del último). De esta forma, los tratamientos con nutrientes recibieron diariamente una concentración de $133 \mu\text{g P- PO}_4 \text{ L}^{-1}$ y $1.02 \text{ mg N- NO}_3 \text{ L}^{-1}$ (total adicionado en 9 días: 8.2 mgL^{-1} de N como NaNO_3 y 1.1 mgL^{-1} de P como K_2HPO_4).

Factor - Tiempo de residencia:

Consistió en efectuar diluciones 1: 1 (volumen: volumen) del medio de cultivo de los tratamientos que llevaron el nivel *con*. Se representó un tiempo de residencia del agua de 3.4 días, por lo que se removió diariamente 175 mL del medio, con el sucesivo agregado de 175 mL del agua de la misma muestra del río. El agua del río utilizada para realizar las diluciones fue previamente filtrada por filtros de fibra de vidrio (MGF, Munktell), con retención de partículas de hasta $0.8 \mu\text{m}$ aproximadamente, y se conservó en heladera a lo largo de los días del experimento. El tratamiento con dilución y agregado de nutrientes (NPxdil), se implementó de forma tal que la dilución diaria precediera al agregado de la concentración de nutrientes establecida. Los tratamientos que llevaban el nivel *sin* tuvieron por lo tanto un tiempo de residencia del agua correspondiente a los días de duración del experimento (10 días). Los niveles de tiempo de residencia con los que se trabajó se definieron teniendo en cuenta el ciclo de vida (tiempos generacionales) de algunos organismos fitoplanctónicos claves del Río Negro.

Una vez iniciados los tratamientos, se mantuvo el experimento a lo largo de 10 días bajo las condiciones ambientales anteriormente descritas, para lo cual fue medida y controlada diariamente la temperatura.



Figura 2- Foto del dispositivo del experimento. Se observan las unidades experimentales (botellas de cultivo) en la sala de experimentación climatizada, con la fuente de luz.

5.2.3 Indicadores de respuesta

Se evaluó la respuesta general de la comunidad de fitoplancton a través de la medición diaria de pigmentos *in vivo*: concentración de clorofila *a* y ficocianina por fluorimetría y turbidez total por espectrofotometría (absorbancia a 750 nm). Se estimó además diariamente la absorbancia a 440 nm, para calcular el coeficiente de extinción de la luz dentro de cada unidad experimental según Fabre (2011). Para llevar a cabo estas mediciones se utilizó un fluorómetro de campo modelo Aquafluor (TURNER DESIGNS) y un espectrofotómetro modelo Evolution 60 (THERMO).

A tiempo final se tomaron muestras para el análisis de clorofila *a* por extracción según el método ISO 1992 modificado (Bonilla 2009) en el total de la comunidad y en la fracción menor a 10 μm ($< 10 \mu\text{m}$). Para lo mismo, se filtraron alícuotas de las muestras por una malla de 10 μm de tamaño de poro. También se congelaron muestras para analizar toxinas (microcistinas totales) mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), en Facultad de Química, realizado por la Dra. Beatriz Brena. La concentración de microcistina (en μgL^{-1}) fue estandarizada por clorofila *a* ($\mu\text{g}\mu\text{g}$ de clorofila a^{-1}) y por unidad de fluorescencia relativa de ficocianina (μgUFR de ficocianina $^{-1}$). Por otro lado se separó un volumen de muestra para determinar la concentración de nutrientes (N y P) disueltos y totales a través de métodos colorimétricos y espectrofotometría. El nitrato se determinó por el método de salicilato de sodio, el amonio por azul de idofenol, el fosfato por molibdato de amonio y el fósforo y nitrógeno total por oxidación con persulfato de potasio (APHA 1995).

Finalmente, se fijaron muestras con solución de lugol y se mantuvieron en condiciones de oscuridad para el posterior conteo y cálculo del biovolumen de la comunidad fitoplanctónica. El conteo se realizó en cámaras de Sedwick-Rafter de 1 mL, mediante el conteo de campos al azar hasta alcanzar 100 individuos del organismo más abundante, con un microscopio óptico invertido OLYMPUS CKX40. Se identificaron las cianobacterias a nivel de género y los organismos eucariotas a nivel de grandes grupos taxonómicos. Se tomaron medidas de las dimensiones lineales necesarias (largo, ancho y profundidad en μm) de algunos de los organismos cuantificados para el cálculo de biovolumen específico, utilizando formas geométricas sencillas aproximadas a la forma del organismo (Hillebrand *et al.* 1999). Se midieron todas las colonias del género *Microcystis* cuantificadas en cada tratamiento y se aproximó su forma a la de un «Elipsoide prolado», según Hillebrand *et al.* 1999. Para esto, se debió estimar la profundidad de la colonia utilizando la graduación del micrómetro del microscopio. Todas las mediciones se realizaron para cada unidad experimental.

5.2.4 Análisis de datos

Se realizaron Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías (factor 1: dilución, factor 2: nutrientes) para comparar el efecto de los tratamientos sobre los diferentes indicadores y variables medidas (pigmentos *in vivo*, clorofila *a* por extracción de la fracción $\geq 10 \mu\text{m}$ y la fracción $< 10 \mu\text{m}$, absorbancia 440 nm, concentración de microcistinas). Para esto se ajustó el siguiente modelo lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + (NP*dil)_{ij} + NP_i + dil_j + \varepsilon_{ijk}$$

donde Y_{ijk} es la variable de respuesta del *i*-ésimo nivel del factor Nutriente (*NP*), con el *j*-ésimo nivel del factor dilución (*dil*) de la *k*-ésima repetición, μ es la media poblacional, $(NP*dil)_{ij}$ es el efecto de la interacción del *i*-ésimo nivel del factor *NP* y el *j*-ésimo nivel del factor *dil*, NP_i es el efecto del *i*-ésimo nivel del factor *NP*, dil_j es el efecto del *j*-ésimo nivel del factor *dil*, y ε_{ijk} es el error asociado al *i*-ésimo nivel de *NP* con el *j*-ésimo nivel de *dil* de la *k*-ésima repetición. Para todos los casos se comprobó el cumplimiento de los supuestos propios al modelo de normalidad y homogeneidad de varianza.

Por otro lado, se realizaron correlaciones de Pearson entre las diferentes variables bióticas monitoreadas (concentración de clorofila *a*, pigmentos *in vivo*, biovolumen total, biovolumen de cianobacterias, biovolumen de *Microcystis sp.*, biovolumen de fitoplancton eucariota, riqueza taxonómica y concentración de microcistina).

Para los análisis estadísticos se usaron los programas Sigma Plot (11.0), CANOCO (4.0) y R (3.2.0).

6 Resultados

6.1 Datos de campo del Río Negro

El biovolumen de fitoplancton varió a lo largo de todo el río, encontrándose en los sitios 9 y 13, correspondientes a zonas de embalse, valores mayores al resto (Fig. 3). Además, se registraron diferencias en la composición de la comunidad fitoplanctónica en los diferentes sitios. Las estaciones correspondientes a los embalses (9, 11 y 13) se encontraron dominadas por cianobacterias, con excepción de los sitios correspondientes al Embalse Rincón de Bonete (3 y 5). Fue posible observar que en los embalses el biovolumen de cianobacterias (BV ciano) fue más de 16 veces superior al de los sitios precedentes en todos los casos (BV ciano sitio 3/ BV ciano sitio 2= 16.2). Sin embargo, en las zonas de río dicho aumento no fue mayor a 5 veces (BV ciano sitio 17/ BV ciano sitio 16= 4.6) (Fig. 4). Por otro lado, los sitios aguas abajo respecto al Embalse de Palmar (14, 15, 16 y 17) también presentaron una alta proporción de cianobacterias que fue disminuyendo en un gradiente espacial aguas abajo del Embalse Palmar. En general, en las estaciones donde dominaron las cianobacterias fue poco frecuente la ocurrencia de taxa eucariotas con excepción de las diatomeas (Fig. 4).

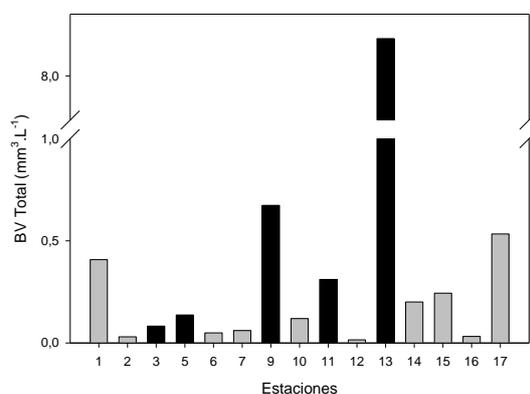


Figura 3- Biovolumen total (BV Total) en las estaciones muestreadas del Río Negro en marco de la campaña de DINAMA de febrero del 2013. Con negro se identifican las estaciones que se corresponden con zonas de embalse, y con gris aquellas que se corresponden con zonas de río.

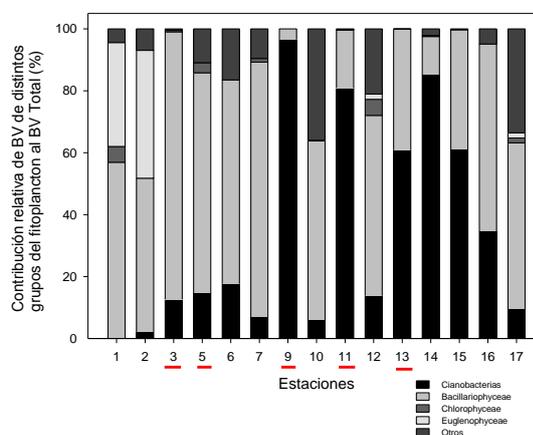


Figura 4- Contribución relativa del biovolumen (BV) de varios grupos de la comunidad de fitoplancton al biovolumen total de la comunidad fitoplanctónica (BV Total) en cada estación de muestreo. Las estaciones subrayadas con una línea roja son aquellas que se corresponden con las zonas de embalse.

El biovolumen de cianobacterias alcanzó los mayores valores en tres estaciones, que se corresponden con los Embalses Baygorria y Palmar (Fig. 5). La concentración de

clorofila a no superó los $5 \mu\text{gL}^{-1}$ en muchos de los sitios muestreados, con excepción del sitio 13 (Embalse Palmar) y el sitio 17 (aguas abajo), donde se encontraron concentraciones elevadas (Fig. 6).

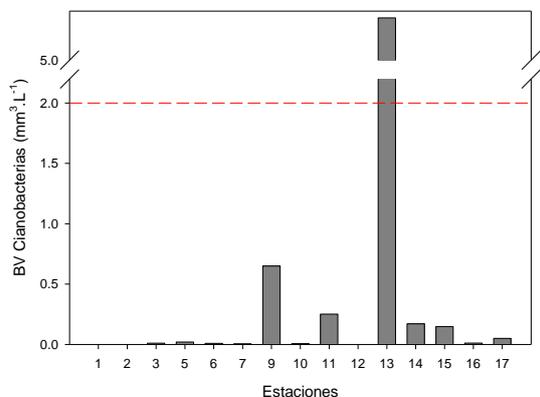


Figura 5- Biovolumen (BV) de cianobacterias de cada una de las estaciones muestreadas del Río Negro en marco de la campaña de DINAMA de verano del 2013. La línea roja punteada indica el valor del Nivel Guía 1 para aguas de uso recreativo determinados por la OMS ($2.0 \text{ mm}^3\text{L}^{-1}$).

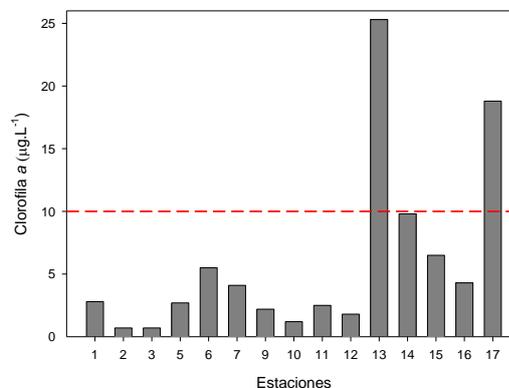


Figura 6- Concentración de Clorofila a en las estaciones muestreadas del Río Negro en marco de la campaña de DINAMA de verano del 2013. La línea roja punteada indica el valor del Nivel Guía 1 para aguas de uso recreativo recomendada por la OMS ($10 \mu\text{gL}^{-1}$).

En línea con lo observado, se encontró que existe una tendencia hacia el aumento de la proporción de cianobacterias en el total del biovolumen de cada estación a lo largo del curso del río (Fig. 7).

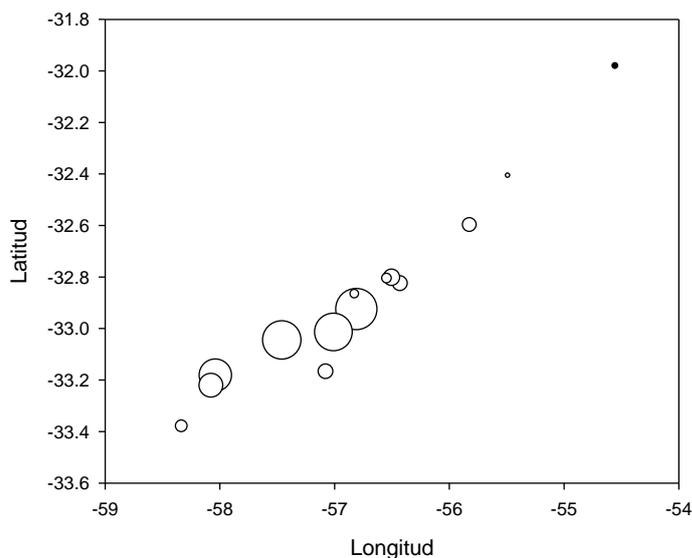


Figura 7- Gráfico de burbujas donde se puede ver la dispersión del biovolumen de cianobacterias a lo largo de las estaciones de muestreo en los gradientes latitudinal y longitudinal. El diámetro de las burbujas es proporcional a la raíz cuadrada del biovolumen relativo de cianobacterias totales (%) en cada estación. El punto negro (esquina superior derecha) representa la estación 1 en la cual no se detectaron cianobacterias.

Los primeros dos ejes del Análisis de Correspondencia (CA), explicaron un 38 % del total de la variación entre las estaciones muestreadas a partir de la composición de especies (20.5 % correspondiente al primer eje, y 17.5 % al segundo) (Fig. 9). Casi todas las estaciones se agruparon indistintamente en el cuadrante inferior izquierdo (Fig. 9), donde se encontraron los géneros fitoplanctónicos más frecuentes. En dicho cuadrante también se encontraron los géneros más abundantes de cianobacterias, sobre todo las del género *Microcystis*, ubicadas cercanas a las estaciones 9 y 13. Las 2 estaciones aguas arriba (1 y 2) se alejan del resto, siendo ambas, las que presentaron los menores valores de biovolumen de cianobacterias. Gran parte de los géneros del grupo Bacillariophyceae se distribuyeron en el área de valores positivos del Eje 2.

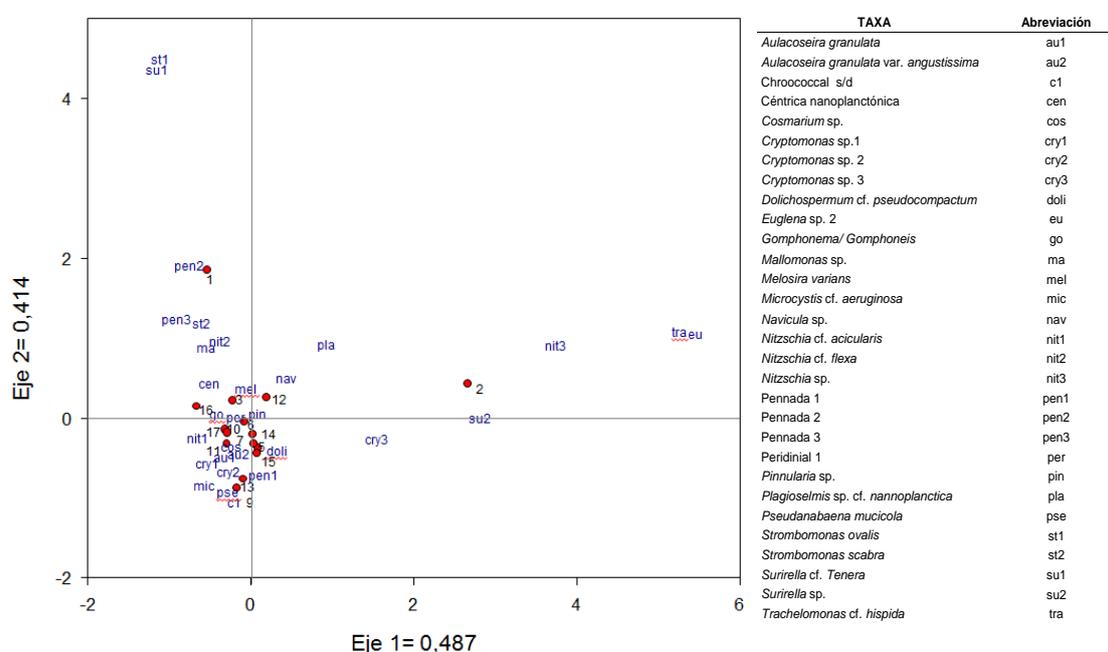


Figura 9- Análisis de Correspondencia de la estructura de fitoplancton del Río Negro, febrero del 2013. Valores de los ejes: Eje 1= 0.487 y Eje 2= 0.414. Los puntos rojos con números representan las 15 estaciones del Río Negro (Fig. 1) y las abreviaciones se corresponden con los taxa, definidos en la tabla a la derecha.

La agrupación a partir de las diferentes variables abióticas de los sitios muestreados del Río Negro permitió diferenciar tres zonas de río: aguas arriba (A), aguas abajo (C), y otro grupo heterogéneo que agrupó a los embalses y a los sitios entre embalses más el sitio 14 (contiguo al sitio de embalse 13) (B) (Fig. 10).

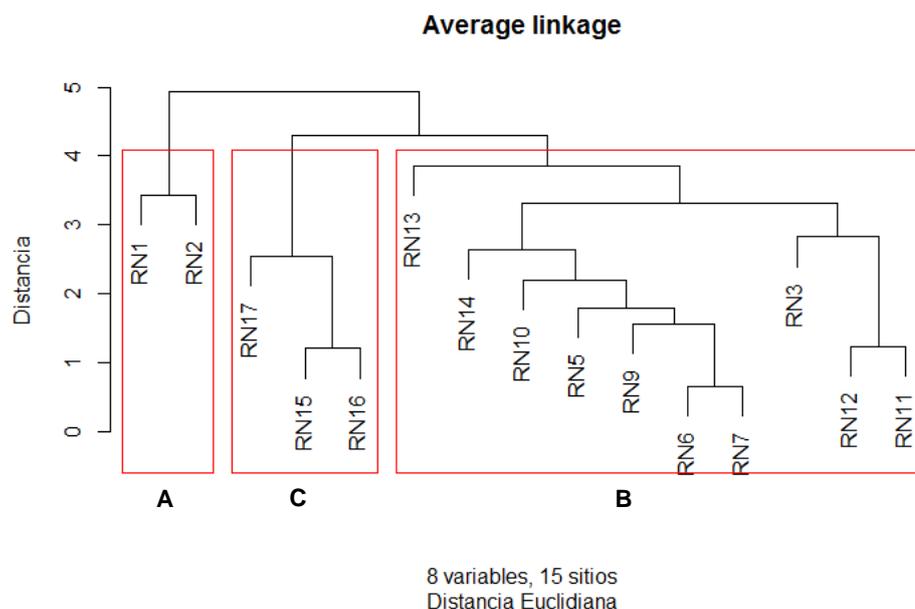


Figura 10- Dendrograma construido a partir de la disimilaridad entre los sitios de muestreo del Río Negro (2013) para las variables abióticas que se muestran en la Tabla 4. Se utilizó el método *Average linkage* (mínima distancia de Gower). Las letras A, B y C, se corresponden con los grupos definidos a partir de un corte arbitrario que se realizó a la distancia 4.

En la Tabla 4 se presentan los estadísticos muestrales de las variables abióticas analizadas para cada uno de los tres grupos definidos a partir del dendrograma.

Tabla 4- Descripción de las variables físicoquímicas medidas en las estaciones de muestreo del Río Negro en la campaña de febrero 2013, agrupadas según su similitud. A, aguas arriba de los embalses (n=2); B, aguas entre los embalses, los embalses y sitio 14 (n=10); C, aguas abajo (n=3). Se indica la media junto con el desvío estándar (\pm), mínimo y máximo (mín-máx) de las distintas variables: Temperatura (T), porcentaje de oxígeno disuelto (% OD), pH, conductividad (Cond.), alcalinidad (Alcal.), nitrógeno total (NT) y fósforo total (PT).

| | A | B | C |
|--|--------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| T (°C) | 24.30 \pm 0.57 (23.9 - 24.7) | 23.68 \pm 0.56 (22.7 - 24.3) | 23.17 \pm 0.06 (23.1 - 23.2) |
| % OD | 66.75 \pm 5.30 (63.0 - 70.5) | 78.82 \pm 5.87 (68.5 - 89.9) | 83.70 \pm 1.35 (82.2 - 84.8) |
| pH | 7.26 \pm 0.17 (7.14 - 7.38) | 7.60 \pm 0.10 (7.48 - 7.75) | 7.85 \pm 0.18 (7.71 - 8.05) |
| Cond. (μScm^{-1}) | 107.75 \pm 23.69 (91.0 - 124.5) | 87.69 \pm 10.19 (68.8 - 101.9) | 134.87 \pm 11.14 (126.9 - 147.6) |

| | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Alcal. (mgL⁻¹) | 45.00 ± 8.49 (51.0 - 39.0) | 43.3 ± 7.50 (37.0 - 60.0) | 66.67 ± 3.06 (64.0 - 70.0) |
| NT (mgL⁻¹) | 0.94 ± 0.23 (0.78 - 1.10) | 0.58 ± 0.09 (0.47 - 0.79) | 0.52 ± 0.03 (0.49 - 0.54) |
| PT (mgL⁻¹) | 0.14 ± 0.02 (0.13 - 0.15) | 0.10 ± 0.02 (0.08 - 0.14) | 0.13 ± 0.01 (0.13 - 0.14) |

6.2 Experimento

6.2.1 Indicadores cuantitativos (clorofila por extracción y pigmentos *in vivo*)

Los tratamientos con nutrientes agregados (NP y NPxdil), presentaron un aumento de la señal de clorofila *a in vivo* (Fig. 11). Ambos tratamientos presentaron un mayor crecimiento de la comunidad fitoplanctónica, en particular en el tratamiento NP. También, a tiempo final se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin nutrientes agregados para este indicador ($F_1 = 7.625$, p -valor < 0.05). Una respuesta similar se observó en el análisis de la fracción < 10 μm de la comunidad fitoplanctónica. El factor nutriente fue el que generó las diferencias entre tratamientos ($F_1 = 11.095$, p -valor < 0.05).

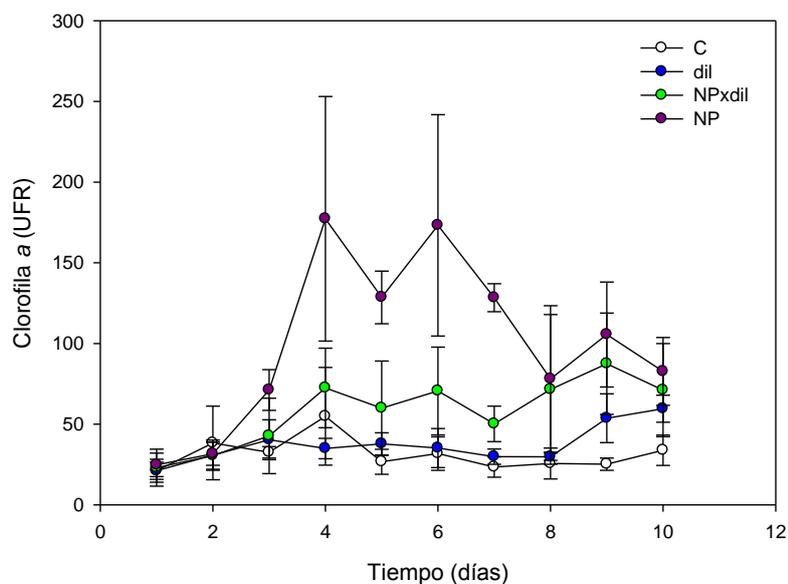


Figura 11- Cambios de la biomasa de la comunidad fitoplanctónica a lo largo del tiempo, estimada como la señal de clorofila *a in vivo* en cada tratamiento. UFR: unidades de fluorescencia relativa estandarizada. Símbolos y abreviaciones, círculo blanco (C), Control; círculo azul (dil), con diluciones; círculo verde (NPxdil), con diluciones y con nutrientes; círculo violeta (NP), con nutrientes. Los símbolos indican valor promedio (líneas verticales: desvío estándar), $n = 3$.

El aumento de la señal de ficocianina en el tratamiento NP indicó el aumento de cianobacterias (Fig. 12). Se observó un efecto de interacción entre ambos factores, en la señal para cianobacterias (ficocianina) ($F_1= 24.56$, $p\text{-valor} < 0.05$), siendo dicho valor en el tratamiento NP mayor respecto a los otros.

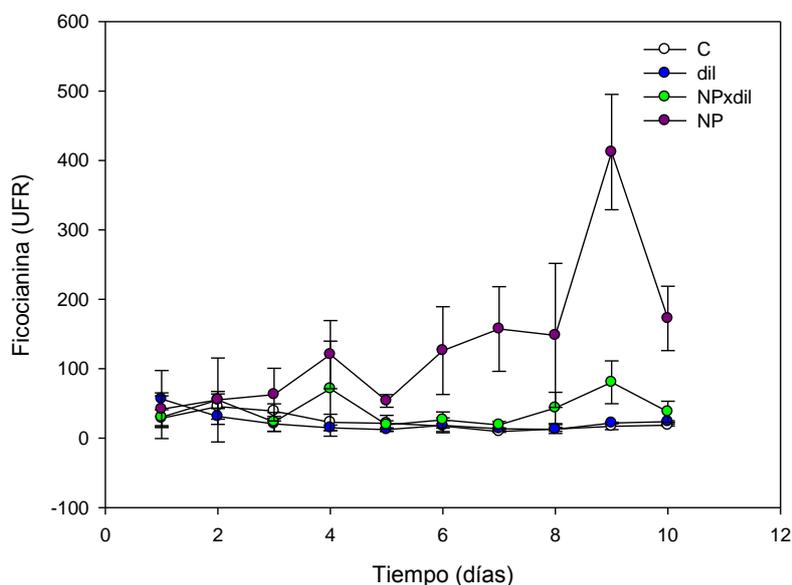


Figura 12- Cambios a lo largo del tiempo de la biomasa de la comunidad fitoplanctónica, estimada como la señal de ficocianina *in vivo* (cianobacterias) en cada tratamiento. UFR: unidades de fluorescencia relativa estandarizada. Símbolos y abreviaciones, círculo blanco (C), Control; círculo azul (dil), con diluciones; círculo verde (NPxdil), con diluciones y con nutrientes; círculo violeta (NP), con nutrientes. Los símbolos indican valor promedio (líneas verticales: desvío estándar), $n= 3$.

A partir del día 7 del experimento se evidenció en el tratamiento NP una mayor cantidad de cianobacterias relativa a la biomasa total de fitoplancton, indicado por el cociente pigmentario ficocianina/clorofila (Fig. 13).

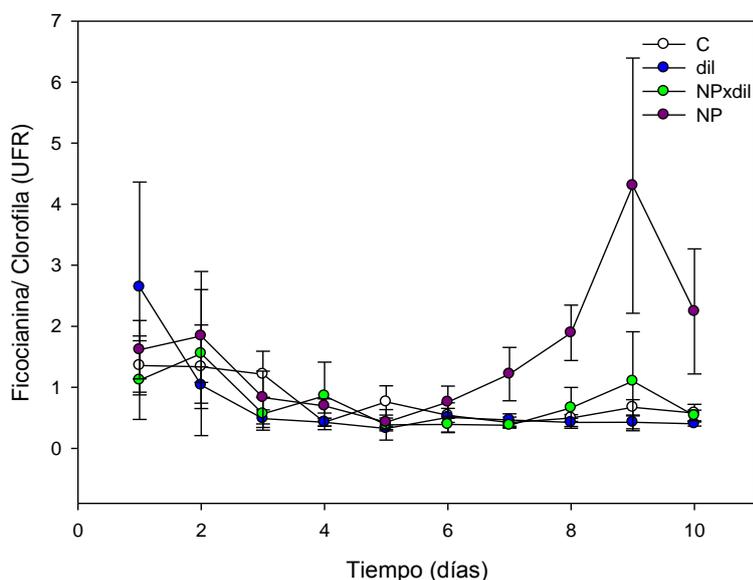


Figura 13- Cambios a lo largo del tiempo de la biomasa de la comunidad fitoplanctónica, estimada como el cociente ficocianina/ clorofila *in vivo* en cada tratamiento. Símbolos y abreviaciones, círculo blanco (C), Control; círculo azul (dil), con diluciones; círculo verde (NPxdil), con diluciones y con nutrientes; círculo violeta (NP), con nutrientes. Los símbolos indican valor promedio (líneas verticales: desvío estándar), n= 3.

Los tratamientos NP y NPxdil son los que presentaron mayores valores de clorofila *a* total en tiempo final (Tabla 5). En términos generales, las concentraciones de nutrientes son superiores en los tratamientos con nutrientes adicionados respecto a los que no y a las concentraciones iniciales. Por otro lado, los tratamientos con nutrientes adicionados presentaron diferencias en la concentración de Nitrógeno Total, NH₄ y NO₃, siendo en todos los casos mayores en el tratamiento NP (Tabla 5).

Tabla 5- Concentración de clorofila *a* (Clo *a*) y de los distintos nutrientes de cada uno de los tratamientos y de la condición inicial del agua, expresados todos en µg L⁻¹ y la relación NT/ PT (átomos). Nutrientes: nitrato (NO₃), amonio (NH₄), nitrógeno total (NT), fosfato (PO₄) y fósforo total (PT). Tratamientos: C, Control; dil, con diluciones; NPxdil, con diluciones y con nutrientes; NP, con nutrientes (n= 3). Se muestra el valor de la media junto con la desviación estándar para cada componente.

| Tratamiento | Clo <i>a</i> | NO ₃ | NH ₄ | NT | PO ₄ | PT | N:P |
|-------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|------------|
| C | 12.83 ± 9.92 | 79.2 ± 22.3 | 1.4 ± 5.0 | 690.7 ± 232.3 | 20.0 ± 1.7 | 118.1 ± 9.0 | 13.0 ± 4.2 |
| dil | 13.75 ± 6.41 | 80.8 ± 16.3 | 26.6 ± 18.6 | 539.1 ± 178.9 | 36.9 ± 4.3 | 89.9 ± 8.5 | 13.4 ± 4.6 |
| NPxdil | 85.27 ± 4.63 | 338.8 ± 87.1 | 22.4 ± 6.0 | 9135.3 ± 171.9 | 659.3 ± 94.3 | 787.0 ± 23.8 | 25.7 ± 1.8 |
| NP | 79.34 ± 35.75 | 7305.3 ± 354.2 | 98.3 ± 101.8 | 8927.3 ± 1985.9 | 546.5 ± 76.1 | 827.6 ± 18.6 | 23.8 ± 4.9 |
| Inicial | | 208.2 ± 29.5 | 4.7 ± 3.1 | 747.1 ± 92.8 | 85.3 ± 9.9 | 97.8 ± 5.9 | 17.0 ± 3.2 |

La fracción ≥ 10 µm de la clorofila *a* por extracción de la comunidad fitoplanctónica, tiene una baja correlación con los datos de clorofila *a in vivo* a tiempo final (r= 0.515; p-valor> 0.05), pero sí se evidenció correlación positiva con la ficocianina *in vivo* (r= 0.652; p-valor< 0.05). Por otro lado, la concentración de clorofila *a* por extracción de la fracción < 10 µm se correlacionó positivamente con la clorofila *a in vivo* (r= 0.622; p-valor< 0.05), y no con la ficocianina (r= 0.0509; p-valor> 0.05).

Se observaron valores significativamente más elevados en la clorofila *a* en los tratamientos con nutrientes con respecto a los sin nutrientes, en ambas fracciones de la comunidad fitoplanctónica (≥ 10 µm: F₁= 31.864, p-valor< 0.001, < 10 µm: F₁= 59.969, p-valor< 0.001) (Fig. 14). En la fracción menor (< 10 µm) fue posible detectar diferencias significativas para el factor dilución (F₁= 58.677, p-valor< 0.001) (Fig. 14-b), siendo el tratamiento dil el que presentó una mayor concentración de clorofila *a* relativa al total.

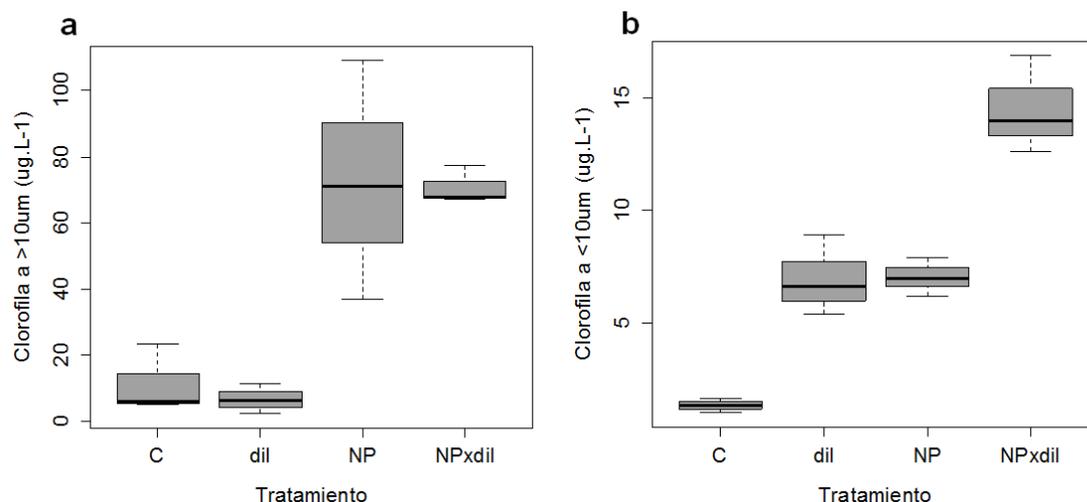


Figura 14- Boxplot de la concentración de la clorofila a fitoplanctónica en tiempo final para cada uno de los 4 tratamientos. **a:** Fracción mayor e igual a 10 µm **b:** Fracción menor a 10 µm. Tratamientos: C, Control; dil, con diluciones; NPxdil, con diluciones y con nutrientes; NP, con nutrientes. La base y el alto de las cajas representan el primer y tercer cuartil respectivamente, las líneas verticales son ± 1.5 veces el rango intercuartílico y la línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana, n= 3.

La concentración de clorofila a por extracción de la fracción de fitoplancton < 10 µm representó menos del 20 % del total, con excepción del tratamiento dil, donde contribuyó con más del 70 % del total (Fig. 15).

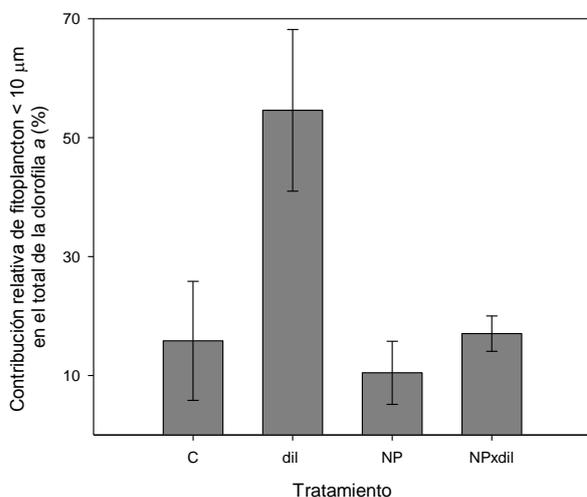


Figura 15- Contribución relativa de la fracción menor a 10 µm tamaño de partícula al total de la Clorofila a por extracción en tiempo final en los 4 tratamientos. Tratamientos: C, Control; dil, con diluciones; NPxdil, con diluciones y con nutrientes; NP, con nutrientes. Líneas verticales: desvío estándar, n= 3.

El ambiente lúminico dentro de cada unidad experimental (coeficiente de extinción de la luz), no varió significativamente entre los tratamientos ($F_3 = 2.938$, p-valor > 0.05).

6.2.2 Composición fitoplanctónica

En todos los tratamientos se encontraron taxa de fitoplancton distribuidos entre los grupos Cyanobacteria, Chlorophyceae, Bacillariophyceae, Cryptophyceae y Zygnematophyceae (Tabla 6).

A lo largo del experimento se detectó visualmente la presencia de grandes colonias de cianobacterias en los tratamientos NP, NPxdil y C. Estas colonias se correspondieron con cianobacterias del género *Microcystis* (Fig. 16). La presencia de otros grupos de cianobacterias, así como de diferentes grupos eucariotas fue poco significativa en términos de biovolumen en los mismos tratamientos. A tiempo final, y en concordancia con lo observado, se encontró que en todos los tratamientos el biovolumen fitoplanctónico estuvo dominado por cianobacterias del género *Microcystis*, con excepción de dil, en donde tuvo un biovolumen menor al 1 % (Fig. 17). Los mismos tratamientos presentaron elevados valores de biovolumen total, y particularmente de *Microcystis* sp., siendo considerablemente mayor en el tratamiento NP (Fig. 18). El biovolumen total se correlacionó positivamente con la ficocianina ($r= 0.888$, $p\text{-valor} < 0.05$).

Tabla 6- Taxa fitoplanctónicas encontradas en las comunidades de todos los tratamientos a tiempo final según los distintos grupos taxonómicos (Cyanobacteria, Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cryptophyceae y Zygnanophyceae) y según el orden en el caso de las cianobacterias.

| Grupo Taxonómico | Taxa |
|--------------------------|--|
| Cyanobacteria | |
| Chroococcal | <i>Microcystis</i> sp. |
| Oscillatorial | Oscillatorial 1 |
| Bacillariophyceae | |
| | <i>Nitzschia</i> cf. <i>acicularis</i> |
| | <i>Nitzschia</i> sp. |
| | <i>Navicula</i> sp. |
| | <i>Aulacoseira</i> sp. |
| | <i>Fragilaria</i> sp. |
| | <i>Cyclotella</i> sp. |
| | Grupo <i>Synedra</i> |
| Chlorophyceae | |
| | <i>Monoraphidium</i> sp. |
| | <i>Scenedesmus</i> sp. |
| | <i>Ankistrodesmus</i> sp. |
| | Clorofita unicelular 1 |
| | Clorofita unicelular 2 |
| | Clorofita colonial 1 |
| | Clorofita colonial 2 |
| Cryptophyceae | |
| | <i>Cryptomonas</i> sp. |
| Crysophyceae | |
| | <i>Mallomonas</i> sp. |

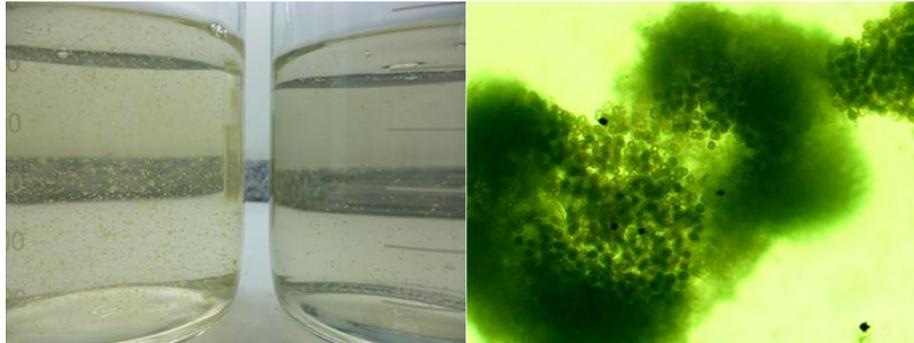


Figura 16- Izquierda: Botellas de cultivo correspondiente a los tratamientos NP (izquierda) y NPxdil (derecha) donde se puede observar una abundante presencia de colonias de cianobacterias del género *Microcystis*. Derecha: Microfotografía de una colonia del género *Microcystis* presente en la comunidad fitoplanctónica del tratamiento NP. Aumento: 200x.

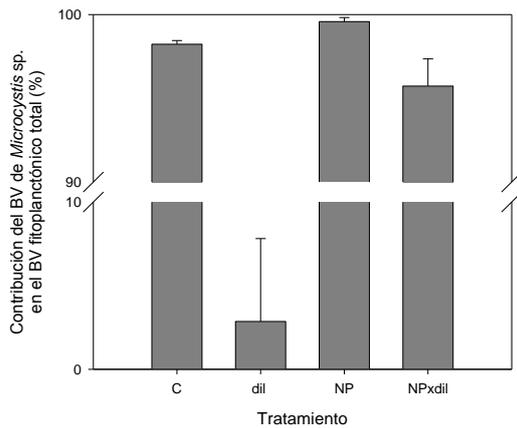


Figura 17- Contribución relativa del biovolumen de cianobacterias del género *Microcystis* (% BV *Microcystis* sp.) al biovolumen total de la comunidad fitoplanctónica (BV fitoplanctónico) a tiempo final. Tratamientos: C, Control; dil, con diluciones; NPxdil, con diluciones y con nutrientes; NP, con nutrientes. Líneas verticales: desvío estándar, n= 3.

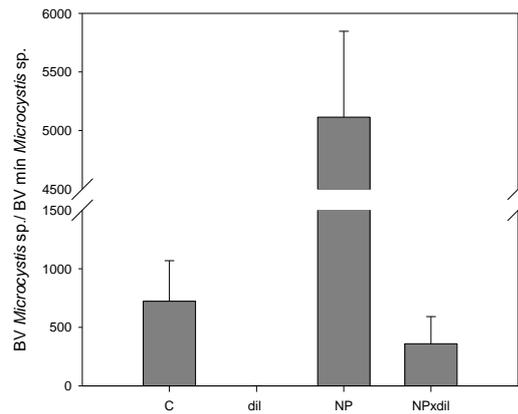


Figura 18- Biovolumen (bv) de cianobacterias del género *Microcystis* relativos de cada tratamiento estandarizados para el valor de biovolumen mínimo (bv min) de *Microcystis* sp. distinto de 0, de entre todos los tratamientos. Tratamientos: C, Control; dil, con diluciones; NPxdil, con diluciones y con nutrientes; NP, con nutrientes. Líneas verticales: desvío estándar, n= 3

La correlación entre el biovolumen de *Microcystis* sp. y el biovolumen de cianobacterias, y el biovolumen total de fitoplancton eucariota de todos los tratamientos fue significativamente inversa ($r = -0.894$, $p\text{-valor} < 0.05$ y $r = -1$, $p\text{-valor} < 0.05$, cianobacterias y eucariotas totales, respectivamente).

6.2.3 Microcistinas totales

Se detectaron concentraciones de microcistina en todos los tratamientos con diferencias significativas entre los mismos ($F= 11.36$, $p\text{-valor} < 0.01$), siendo en el tratamiento NP mayor al resto de los tratamientos (Tabla 7). Por el contrario, en el tratamiento dil, en el cuál el registró de cianobacterias fue muy reducido, se obtuvo un valor muy bajo de microcistina (Tabla 7). No se encontró correlación significativa entre la concentración de microcistina y la clorofila *a*, pero sí hubo una correlación positiva significativa con la ficocianina ($r= 0.944$, $p\text{-valor} < 0.01$). Se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos para el cociente Mic/Fico (concentración de microcistina por unidad de ficocianina) ($F= 12.059$, $p\text{-valor} < 0.01$). El cociente Mic/Clo *a* fue significativamente diferente entre los tratamientos *con* y los *sin* diluir ($F= 11.766$, $p\text{-valor} < 0.01$). El tratamiento C fue el que presentó una mayor concentración de microcistina relativa tanto por μg de clorofila *a* por extracción como por unidad de fluorescencia relativa de ficocianina (Tabla 7).

Tabla 7- Concentración de microcistina de cada tratamiento y la estandarización de dicha concentración con distintos indicadores cuantitativos de fitoplancton: concentración de Microcistina/ concentración Clorofila *a* (Mic/ Clo *a*) y concentración de Microcistina/ Ficocianina (Mic/ Fico). Se presenta el valor de la media \pm el desvío estándar. En cada variable las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. Tratamientos: C, Control; dil, con diluciones; NPxdil, con diluciones y con nutrientes; NP, con nutrientes ($n= 3$).

| Tratamiento | Microcistina (μgL^{-1}) | Mic/ Clo <i>a</i> ($\mu\text{g}\mu\text{g de clo } a^{-1}$) | Mic/ Fico ($\mu\text{gUFR de fico}^{-1}$) |
|---------------|---|--|--|
| C | 8.82 \pm 3.38 b | 0.99 \pm 0.68 a | 0.46 \pm 0.14 a |
| Dil | 0.20 \pm 0.09 b | 0.02 \pm 0.01 b | 0.01 \pm 0.00 b |
| NPxdil | 2.87 \pm 4.10 b | 0.03 \pm 0.05 b | 0.06 \pm 0.07 b |
| NP | 32.35 \pm 9.37 a | 0.44 \pm 0.14 ab | 0.19 \pm 0.02 b |

7 Discusión

Este trabajo contribuye al conocimiento de la composición de la comunidad fitoplanctónica del Río Negro y sus embalses en relación a variables limnológicas. Fue posible identificar diferencias entre los embalses, los sitios aguas arriba y los sitios aguas abajo del río (después de los 3 embalses), en cuanto a la comunidad fitoplanctónica. Por otro lado, el experimento llevado a cabo fue pionero ya que se trabajó con comunidades naturales del Río Negro en microcosmos. Se pudo demostrar el efecto combinado de las variaciones en el tiempo de residencia y de la concentración de nitrato y fosfato sobre el desarrollo y composición de la comunidad fitoplanctónica, como se desarrollará más adelante.

7.1 Potencial riesgo para la salud humana del agua del Río Negro, según indicadores cuantitativos de cianobacterias

En la Campaña de febrero del 2013 del Río Negro se han encontrado elevadas concentraciones de clorofila *a* en varios sitios de muestreo, sobre todo en las zonas embalsadas. En el sitio correspondiente al Embalse Palmar y aguas abajo, la concentración de clorofila *a* supera el Nivel Guía 1 para aguas de uso recreativo recomendado por la OMS (ver Tabla 1). Acorde con estas observaciones, el biovolumen de cianobacterias en ese mismo embalse también superó el Nivel Guía 1 (Chorus & Bartram 1999). Chalar *et al.* (2014) encontraron una mayor e igualmente elevada concentración promedio de clorofila *a* en el embalse Palmar, en comparación con los otros embalses del Río Negro, durante el período de estudio comprendido entre setiembre 2009 y junio 2011. Cabe mencionar que muchas de las características bióticas y abióticas que se observan en el Embalse Palmar dependen en gran medida de los aportes provenientes por el caudal erogado de los Embalses Bonete y Baygorria (Chalar *et al.* 2015). En otros embalses de la región, como el Embalse de Salto Grande (en el Río Uruguay), de tamaño y tiempo de residencia similar al Embalse Palmar, es frecuente encontrar concentraciones de Clorofila *a* que superan los Niveles guía establecidos por la OMS (O'Farrell *et al.* 2012).

Por otra parte, la concentración de clorofila *a* obtenida a tiempo final en todos los tratamientos del experimento superan el Nivel Guía 1 para aguas recreacionales, incluso, en los tratamientos con mayor concentración de nutrientes dicho valor supera el Nivel Guía 2. Por lo que, condiciones de elevada concentración de nitrato y fosfato en el ambiente lo vuelve vulnerable frente al incremento de biomasa fitoplanctónica. La abundante presencia de cianobacterias se torna más riesgosa cuando se trata de

cepas tóxicas, las cuales han sido ya reportadas para el Río Negro (González-Piana *et al.* 2011).

7.2 Toxicidad de la muestra del Río Negro

La muestra natural del Embalse Palmar con la cual se llevó a cabo el experimento presentaron microcistina, indicando la presencia de cianobacterias tóxicas. Debido a los elevados valores de biomasa de cianobacterias determinados en el tratamiento NP, la concentración de microcistina fue igualmente elevada, superando el límite máximo establecido por la OMS (1998) de concentración de microcistina para aguas con fines recreacionales ($20 \mu\text{gL}^{-1}$) (Chorus & Bartram 1999). Por lo tanto, el riesgo para los usuarios es mayor frente a una gran biomasa de cianobacterias.

Por otro lado, el tratamiento C fue el que presentó mayores valores de concentración de microcistina por unidad de biomasa, revelando que las cianobacterias presentes en la muestra fueron más tóxicas por unidad de biomasa cuando crecieron en tiempos de residencia del agua altos y con concentraciones de nutrientes moderadas. Es decir que los organismos (las cianobacterias) fueron más tóxicas cuando crecieron en dichas condiciones, registrando un aspecto acerca de la fisiología de las cianobacterias. A la vez, ante condiciones de bajo flujo hídrico, las toxinas pueden acumularse ya que no son sometidas al efecto de lavado. En los tratamientos con diluciones, se genera una remoción de parte del medio, y consecuentemente de la concentración de microcistina, por eso los valores encontrados de la toxina fueron considerablemente menores respecto a los tratamientos sin diluir. Por lo tanto, para evaluar la peligrosidad potencial de las muestras del Río Negro, respecto a la concentración de toxinas y en relación al uso del agua, es muy importante atender no solo a la cantidad de biomasa, sino que también a determinadas condiciones ambientales.

Estos resultados alertan acerca del potencial riesgo sanitario que se generan en los embalses del Río Negro, en donde se registran frecuentemente elevados valores de biomasa de cianobacterias potencialmente tóxicas, sobre todo en los meses de verano. En los últimos años se detectaron concentraciones muy altas de la cianotoxina microcistina-LR en áreas de acumulación de las floraciones de cianobacterias en los embalses del Río Negro, el mayor registro fue de $2662 \mu\text{gL}^{-1}$ en Palmar, $551 \mu\text{gL}^{-1}$ en Baygorria y $2109 \mu\text{gL}^{-1}$ en Bonete (González-Piana *et al.* 2011).

7.3 El Tiempo de residencia del agua como variable explicativa del desarrollo del fitoplancton

En este trabajo de investigación se observó que la concentración de nitrógeno y fósforo fue similar a lo largo del Río Negro, sin embargo para las variables bióticas (concentración de clorofila *a*, biovolumen y composición fitoplanctónica), sí se encontraron diferencias entre los distintos sitios.

Las características hidrológicas del ambiente contribuyen a explicar el crecimiento y composición de la comunidad de organismos que habitan en un sistema acuático (Padisák *et al.* 1999; Rangel *et al.* 2012; Romo *et al.* 2013; Lu & Gan 2014). En nuestros resultados, las diferencias encontradas para el biovolumen entre los embalses y los sitios de muestreo suprayacentes, sugieren un efecto principal del tiempo de residencia del agua en el crecimiento fitoplanctónico. Lee *et al.* (2014) han demostrado que el tiempo de residencia del agua tiene una relación mucho más fuerte con la concentración de clorofila *a* que la concentración de nutrientes en un embalse pequeño mesotrófico (1.6 km²). De todas formas, los embalses no se encontraban saturados de nutrientes consecuentemente los valores de biovolumen encontrados en la campaña analizada no refleja el gran potencial que tienen los embalses del Río Negro para sostener una gran biomasa de fitoplancton, particularmente de cianobacterias. Llama la atención el bajo biovolumen de fitoplancton encontrado en esta campaña para el Embalse Bonete, el cual es el de mayor superficie y tiempo de residencia de los 3 embalses del Río Negro. Estas observaciones en suma con los bajos valores de caudal del Río Negro y de sus principales tributarios descrito por Chalar *et al.* 2015 en febrero de 2013 y en los meses precedentes, sugieren que el fitoplancton estaba limitado por nutrientes. Si bien bajo caudal podría favorecer el crecimiento del fitoplancton ya que se produce un aumento del tiempo de residencia del agua, cuando los aportes a los embalses son reducidos disminuye el ingreso de nutrientes, consecuentemente el crecimiento del fitoplancton puede verse limitado.

El factor *Tiempo de residencia* no permite explicar la elevada concentración de clorofila *a* que se encuentran en los sitios del río aguas abajo. Sin embargo, podemos atribuir dichos valores a un efecto de arrastre desde los embalses, en donde se produce un aumento y acumulación de fitoplancton.

La importancia del tiempo de residencia como factor clave para explicar el crecimiento del fitoplancton también pudo ser evidenciada a través del experimento llevado a cabo. No obstante, este no fue un factor excluyente. Se observó que en el tratamiento NP se alcanzaron elevados valores de biomasa de fitoplancton en relación al resto de los

tratamientos, incluso en el tratamiento con igual concentración de nutrientes (NPxdil). O'Farrell *et al.* (2012) reportaron para el Embalse de Salto Grande, que las condiciones hidrológicas fueron los factores determinantes en la regulación de las floraciones de cianobacterias de los géneros *Dolichospermum* y *Microcystis* (como las presentes en las muestras del Río Negro). Ya que la abundancia de estas fueron disminuyendo a medida que aumentaba la dilución del medio por la descarga.

7.4 Dominancia de cianobacterias coloniales en tiempos de residencia mayores

En líneas generales se observó que los géneros de cianobacterias estuvieron asociados a las zonas de embalses y aguas abajo, principalmente las *Microcystis* sp. Este género de cianobacterias ha sido igualmente dominante en los meses de verano en embalses con fines de producción hidroeléctrica y con dimensiones comparables con los embalses del Río Negro (Nogueira 2000; O'Farrell *et al.* 2012). Por ejemplo, para el Embalse Jurumirim (Brasil), se reportó una baja asociación entre la ocurrencia de *M. aeruginosa* y sitios influenciados por el río y, sin embargo, una alta ocurrencia de esta especie en sitios con mayores tiempos de residencia del agua (Nogueira 2000).

A través del Análisis de Correspondencia, fue posible observar que los diversos grupos de fitoplancton se agrupan indistintamente a lo largo del Río Negro, con excepción de los dos sitios de muestreo aguas arriba. Estos sitios son los que más se diferencian del resto en cuanto a la composición fitoplanctónica, ya que los géneros de cianobacterias estuvieron prácticamente ausentes, desde este punto de vista pueden ser considerados como los sitios más prístinos. La comunidad fitoplanctónica del resto de las estaciones se encuentra influenciada por la gran cantidad de biomasa de fitoplancton producida históricamente en el Embalse Bonete (Chalar *et al.* 2015). Las taxas presentes en la mayoría de las estaciones se corresponden con grupos típicos de ríos, y que ya han sido reportados en la región: Bacillariophyceae, Cryptophyceae, Chlorophyceae y Euglenophyceae (Pérez 2002) y las Cianobacterias que ocurrieron con mayor frecuencia en los embalses. Dentro de los grupos de fitoplancton eucariota, la clase que dominó en términos de biovolumen y ocurrencia a lo largo del Río Negro fue Bacillariophyceae. Esta clase presenta varios géneros que ocurren con frecuencia en sistemas eutróficos (Reynolds 1984), como los encontrados en este trabajo. Similares resultados fueron reportados en otros estudios para el Río Negro (Bonilla 1997; Pérez *et al.* 1999; Chalar *et al.* 2014), Salto Grande (De León & Chalar 2003) y para el Embalse Jurumirim (Nogueira 2000).

En el experimento, la remoción diaria de aproximadamente un $\frac{1}{4}$ del volumen del medio total en los tratamientos con dilución, limitó el crecimiento de las grandes colonias de *Microcystis* sp., las cuales estaban presentes al inicio en todos los tratamientos. Estos organismos además de tener grandes requerimientos nutricionales poseen tiempos generacionales mayores por tratarse de organismos de gran tamaño. La tasa de crecimiento exponencial en cultivos de *Microcystis aeruginosa* es de aproximadamente 0.48 días^{-1} , por lo cual requieren de ambientes calmos para incrementar su biomasa (Reynolds 1984). A pesar de que en la muestra del Río Negro con la que se llevó a cabo el experimento contenía un importante inóculo de *Microcystis* sp., estas solo pudieron aumentar su biomasa bajo condiciones de altas concentraciones de N y P, y tiempo de residencia. Las condiciones calmas que se dan en lagos y embalses permiten que *Microcystis* sp. incremente su biomasa pudiendo desarrollar floraciones (Huisman *et al.* 2005). Romo *et al.* (2013) encontraron correlación negativa entre la tasa de renovación del agua y el biovolumen del fitoplancton, la clorofila *a*, y entre el biovolumen de *Microcystis aeruginosa* (entre 0.01 y $30.49 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$) para un lago costero con variaciones en el tiempo de residencia. Por otro lado, se pudo determinar en el Lago Erie que tiempos de residencia de entre 40 y 80 días son suficientes para la generación de floraciones del género *Microcystis*, combinado con altos aportes de nutrientes (Michalak *et al.* 2013).

7.5 Cambios de la comunidad fitoplanctónica según el tratamiento

Se evidenció un efecto de los distintos niveles de los factores, ya que el crecimiento del fitoplancton fue diferente entre los tratamientos. Las concentraciones de nutrientes a tiempo final de los tratamientos muestran que los tratamientos sin adición de nutrientes se encuentran probablemente limitados por N (concentraciones de NT similares a ambientes oligo-mesotróficos), a pesar de ser ricos en PT (relación N:P= 13). Esta tendencia se apoya en que relaciones N:P más elevadas resultaron en un mayor desarrollo de biomasa (N:P aprox. 25). Asimismo, las concentraciones de N iniciales (del agua del Embalse Palmar, con la que se llevó a cabo el experimento), se corresponden con un estado mesotrófico. Por lo tanto, frente a un agregado de nutrientes la primer respuesta de los organismos fue la de crecer, como se observa en los tratamientos con nutrientes (NP y NPxdil), a partir de los pigmentos *in vivo*.

En el tratamiento NP se encontró una concentración de NO_3 considerablemente mayor a la esperada, por lo que se presume un posible error experimental en la concentración agregada de la sal de Nitrato, alguno de los días del experimento. De todas formas se desestimó la diferencia de concentraciones de dicho nutriente entre el

tratamiento NP y NPxdil como una posible fuente de variación, ya que ambos presentaron concentraciones características de ambientes hipereutróficos. No obstante, la respuesta a lo largo del tiempo evidenciaría el efecto del factor tiempo de residencia. El decaimiento que se observa para el indicador clorofila *a in vivo* en el tratamiento NP coincide aproximadamente con el aumento abrupto de cianobacterias según el indicador ficocianina. Por lo tanto, se podría concebir como un remplazo en la comunidad fitoplanctónica en dicho tratamiento. En los primeros días, la adición de nutrientes fue aprovechada por el fitoplancton eucariota, que al estar dominado por pequeñas diatomeas o clorofitas pudieron aumentar su biomasa prontamente. Luego las cianobacterias, dominadas por las colonias de *Microcystis* sp., que son de las de crecimiento más lento dentro del fitoplancton, comenzaron a crecer dominando copiosamente la comunidad fitoplanctónica. La relación de los pigmentos *in vivo* (ficocianina/clorofila *a*) apoyan estas inferencias, ya que se puede ver que la biomasa relativa de cianobacterias disminuye con el correr de los días en todos los tratamientos con excepción de NP.

La limitación del crecimiento de las grandes cianobacterias, por el corto tiempo de residencia del agua del tratamiento NPxdil, permitió que las microalgas eucariotas con tasas de crecimiento mayores que *Microcystis* sp., como Clorofitas (2 días^{-1}) o diatomeas tipo *Fragilaria* (1.37 días^{-1}) (Reynolds 1984), se desarrollaran a lo largo del experimento. Por lo que, el menor tiempo de residencia benefició indirectamente al nanoplancton (compuesto principalmente por Clorofitas y pequeñas diatomeas). En el tratamiento dil, hacia los últimos días, se puede observar un leve aumento de la biomasa de microalgas eucariotas según la clorofila *a*. Las condiciones de menor concentración de nutrientes y la remoción diaria del medio de este tratamiento dificultaron el crecimiento de muchos organismos dentro del fitoplancton. Sin embargo, cierta fracción de la comunidad fitoplanctónica logró adaptarse a dichas condiciones y, al no presentar otros organismos que compiten por los recursos, pudieron prosperar. Similar a lo descrito para el tratamiento NPxdil, los organismos que pudieron crecer han de ser de pequeña talla, con tasas de crecimiento altas y, en este caso, con requerimientos nutricionales que pudieron ser abastecidos con las concentraciones naturales del medio.

Las inferencias realizadas a partir de las observaciones de las variaciones diarias de la biomasa fitoplanctónica según los pigmentos *in vivo* son apoyadas con los resultados obtenidos a partir de la clorofila *a* por extracción de las 2 fracciones de la comunidad fitoplanctónica analizada. Estos resultados en conjunto con los antes expuestos permiten reafirmar las predicciones planteadas acerca de los experimentos en el

presente trabajo de investigación: el fitoplancton de menor talla tiene tiempos generacionales muy cortos, por lo que pudieron crecer en los tratamientos con menores tiempos de residencia. En los tratamientos con mayores tiempos de residencia, pudieron mantenerse y en algún caso aumentar su biomasa (tratamiento NP) las grandes cianobacterias coloniales, que limitaron el crecimiento del fitoplancton menor a 10 μm .

A partir de los datos de campo, los cuales fueron apoyados con la implementación del experimento, fue posible reconocer que solo los nutrientes, como factor, no son suficientes para explicar los altos valores de biomasa que desarrollaron las grandes cianobacterias formadoras de floraciones. En este escenario cobra un rol sustancial la hidrología del ambiente. Variaciones en el tiempo de residencia pueden afectar la estructura de la comunidad fitoplanctónica: las condiciones de mayor estabilidad física generan el ambiente adecuado para el crecimiento de cianobacterias, particularmente de las grandes coloniales formadoras de floraciones potencialmente tóxicas.

8 Conclusiones

A través del experimento se pudo determinar el papel fundamental que tiene el tiempo de residencia del agua, en combinación con altas concentraciones de N y P, en el desarrollo de floraciones de cianobacterias de gran tamaño como las del género *Microcystis* en un sistema lótico clave para el país. Los altos tiempos de residencia de los embalses, lo convierten en un escenario propicio para el crecimiento abrupto de grandes cianobacterias formadoras de floraciones, cuando aumentan las concentraciones de nutrientes debido a los aportes externos desde la cuenca, tornándose en una situación de alerta. Es decir que condiciones de eutrofia combinadas con altos tiempo de residencia generan vulnerabilidad en el ambiente favoreciendo la aparición de floraciones algales, particularmente de cianobacterias. Para el Río Negro y sus embalses es clave controlar los aportes externos, tanto los difusos como los puntuales, evitando elevadas concentraciones de nutrientes. En los sistemas lóticos, los tributarios, la cuenca y los procesos biogeoquímicos influyen mucho sobre las diversas variables del río, por lo que, en futuros estudios, así como en programas de monitoreo es sustancian tenerlos en cuenta.

La creación de embalses para diversos fines es cada vez más frecuente a medida que aumenta el consumo humano. Las alteraciones hidrológicas de sistemas lóticos eutrofizados, al aumentar el tiempo de residencia, generan condiciones favorables para la aparición de floraciones de cianobacterias. Por lo tanto, a la hora de evaluar los beneficios que los embalses otorgan, se debe considerar las consecuencias indeseables que estos producen en el ambiente, para los usuarios y el resto de la biota.

Finalmente, el conocimiento generado a partir de esta investigación resulta un aporte fundamental para el área de conocimiento, pues se generó evidencia acerca de la fisiología y ecología de las cianobacterias.

9 Agradecimientos

ANII por financiar el presente proyecto de tesis (INI_X_2013_1_101205).

A mis tutores, Dra. Sylvia Bonilla y Dr. Luis Aubriot.

Sección Limnología de la Facultad de Ciencias.

Proyecto ANII FCE 6384, Convenio DINAMA- Facultad de Ciencias-
Cianobacterias, Beatriz Brena y Macarena Pérez de la Facultad de Química
(UdelaR).

Fátima Martigani, Bruno Cremella, Andrea Piccardo, Ma. del Carmen Pérez, Noelia
Gobel, Gabriela Illarze y Victoria Olivari.

Y a todos los seres que me llenan de amor!

10 Referencias bibliográficas

- Allan, J. D. 2004. *Landscapes and riverscapes: The influence of land use on stream ecosystems*. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 35: 257-284
- Aubriot, L., S. Bonilla & G. Falkner. 2011. *Adaptive phosphate uptake behaviour of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations*. FEMS Microbiology Ecology, 77: 1-16
- Babica, P., L. Bláha & B. Marsalek. 2006. *Exploring the natural role of microcystins. A review of effects on photoautotrophic organisms*. Journal of Phycology 42: 9-20
- Bonilla, S. 1997. *Composición y abundancia fitoplanctónica de tres embalses en cadena sobre el río Negro, Uruguay*. Iheringia, Série Botânica, 49: 47-61
- Bonilla, S. 2009. *Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de monitoreo*. UNESCO, Montevideo
- Briand, J. F., C. Lebourlanger, J. F. Humbert, C. Bernard & P. Dufour. 2004. *Cylindrospermopsis Raciborskii (cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming?* Journal of Phycology, 40: 231-238
- Chalar, G., D. Fabián, M. Gonzalez-Piana & L. Delbene. 2011. *Limnología de los embalses del Río Negro: noviembre 2000-marzo 2009*. Sección Limnología, Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, <http://limno.fcien.edu.uy>
- Chalar, G., D. Fabián, M. Gonzalez-Piana. & L. Delbene. 2012. *Caracterización limnológica de los embalses del Río Negro durante el período setiembre 2009-junio 2011*. Sección Limnología, Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, <http://limno.fcien.edu.uy>
- Chalar, G., M. Gerhard, M. González-Piana & D. Fabián. 2014. *Hidrodinámica y eutrofización en tres embalses subtropicales en cadena*. En: *Procesos geoquímicos superficiales en Iberoamérica*. (Eds. J.E. Marcovecchio, S.E. Botté & R.H. Freije). Red Iberoamericana de Física y Química Ambiental, Sociedad Ibero-Americana de Física y Química Ambiental, Bahía Blanca: 121-147
- Chalar, G., D. Fabián, M. Gonzalez-Piana. & A. Piccardo. 2015. *Informe interanual. Estado y evolución de la calidad de agua de los tres embalses del Río Negro. Período Setiembre 2011- Marzo 2015*. Sección Limnología, Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, <http://limno.fcien.edu.uy>
- Chorus, I. & J. Bartram. 1999. *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Chapman & Hall, London

- Codd, G. A., L. F. Morrison & J. S. Metcalf. 2005. *Cyanobacterial toxins: risk management for health protection*. Toxicology and applied pharmacology, 203: 264-272
- De León, L. 2000. *Floración de cianobacterias tóxicas en el embalse Rincón del Bonete (febrero 2000)*. Sección Limnología, Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo: <http://limno.fcien.edu.uy>
- De Leon, L. & J. Yunes. 2001. *First report of a Microcystin-Containing Bloom of the Cyanobacterium Microcystis aeruginosa in the La Plata River, South America*. Environmental Toxicology and Water Quality, 16: 110-112
- De Leon, L. & G. Chalar. 2003. *Phytoplankton abundance and diversity at Salto Grande Reservoir (Uruguay - Argentine). Seasonal cycle and spatial distribution*. Limnetica, 22: 103-113
- DINAMA. 2011. *Monitoreo y evaluación de calidad de agua. Plan para la definición de una línea de base del Río Negro. Informe Técnico*. Departamento de Calidad Ambiental. División Evaluación de la Calidad Ambiental, Montevideo: <http://www.mvotma.gub.uy/biblioteca/documentos-de-ambiente>
- Fabre, A. 2011. *Flexibilidad fenotípica de la Cianobacteria invasora Cyndrospermopsis raciborskii en un gradiente lumínico*. Tesis de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo
- Ferber, L., S. Levine, A. Lini & G. Livingston. 2004. *Do cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen?* Freshwater Biology, 49: 690-708
- González-Piana, M., D.L. Fabián & G. Chalar. 2011. *Toxics blooms of Microcystis aeruginosa in three of the Rio Negro reservoirs, Uruguay*. Harmful Algae, 43: 16-17
- Graham, L. E. & L. W. Wilcox. 2000. *Algae*. Prentice Hall, New Jersey
- Hillebrand, H., C.D. Dürselen, D. Kirschtel, D. Pollinger & T. Zohary. 1999. *Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae*. Journal of Phycology, 35: 403-424
- Huisman, J., C. Matthijs & P. Visser Eds. 2005. *Harmful Cyanobacteria, aquatic ecology series*. Springer, Dordrecht
- ISO. 1992. *Water quality measurement of biochemical parameters spectrophotometric determination of chlorophyll-a concentration*. International Organization for Standardization, Ginebra: 1-6
- Jang, M. H., K. Ha, G. J. Joo & N. Takamura. 2003. *Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton*. Freshwater Biology, 48: 1540-1550
- Kalff, J. 2002. *Limnology: inland water ecosystems*. Prentice-Hall, New Jersey

- Lampert, W. & U. Sommer. 2007. *Limnoecology, the ecology of lakes and streams*. Oxford University Press, Oxford
- Lee, S., S. Lee, S. H. Kim, H. Park, S. Park & K. Yum. 2012. *Examination of Critical Factors Related to Summer Chlorophyll a Concentration in the Sueo Dam Reservoir, Republic of Korea*. Environmental Engineering Science, 29: 502-510
- Lehman, P. W., S. J. Teh, G. L. Boyer, M. L. Nobriga, E. Bass & C. Hogle. 2010. *Initial impacts of Microcystis aeruginosa blooms on the aquatic food web in the San Francisco Estuary*. Hydrobiologia 637: 229- 248
- Leigh, C, M.A. Burford, D.T Roberts & J.W. Udy. 2010. *Predicting the vulnerability of reservoirs to poor water quality and cyanobacterial blooms*. Elsevier, 15: 4487-4496
- Lu, Z. & J. Gan. 2014. *Controls of seasonal variability of phytoplankton blooms in the Pearl River Estuary*. Deep Sea Reserch Part II: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.12.011>
- Michalak, A. M., E. Anderson, D. Beletsky *et al.* 2013. *Record-setting algal bloom in Lake Erie caused by agricultural and meteorological trends consistent with expected future conditions*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110: 6448-6452
- MGAP - Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. 2012. *Anuario agropecuario*. DIEA, Montevideo
- Nogueira, M.G. 2000. *Phytoplankton composition, dominance and abundance as indicators of environmental compartmentalization in Jurumirim Reservoir (Paranapanema River), São Paulo, Brazil*. Hydrobiologia 431: 115-128
- O'Farrell, I., F. Bordet & G.Chaparro. 2012. *Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: validation of dominant eco-strategies*. Hydrobiologia, 698: 175-190
- Padisák J., J. Köhler & S. Hoeg. 1999. *The effect of changing flushing rates on development of late summer Aphanizomenon and Microcystis populations in a shallow lake, Müggelsee, Berlin, Germany*. En: *Theoretical Reservoir Ecology and its Applications* (Eds. J.G. Tundisi & M. Straskraba). International Institute of Ecology, Brazilian Academy of Sciences and Backhuys Publishers, São Carlos, SP: 411-423
- Pérez, M.C., S. Bonilla & G. Martínez. 1999. *Phytoplankton community of a polymictic reservoir, La Plata river basin, Uruguay*. Revista Brasileira de Biologia, 59: 535-541
- Pérez, M.C. 2002. *Fitoplancton del Río Negro, Uruguay*. Limnetica, 21: 81-92

- Pérez, M., G. Gonzalez-Sapienza, D. Sienra, G. Ferrari, M. Last, J. A. Last & B. M. Brena. 2013. *Limited analytical capacity for cyanotoxins in developing countries may hide serious environmental health problems: Simple and affordable methods may be the answer*. *Journal of Environmental Management*, 114: 63-71
- Rangel, L., L.H.S. Silva, P. Rosa, F. Roland & V.L.M. Huszar. 2012. *Phytoplankton biomass is mainly controlled by hydrology and phosphorus concentrations in tropical hydroelectric reservoirs*. *Hydrobiologia*, 693: 13-28
- Reynolds, C. 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge
- Reynolds, C. 2006. *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press, Cambridge
- Romo, S, J. Soria, F. Fernández, Y. Ouahid & Á. Barón-Solá. 2013. *Water residence time and the dynamics of toxic cyanobacteria*. *Freshwater Biology*, 58: 513- 522
- Soares, M.C., M.M. Marinho, S.M.F.O. Azevedo, C.W.C. Branco & V.L.M. Huszar. 2008. *The effects of water retention time and watershed features on the limnology of two tropical reservoirs in Brazil*. *Lakes & Reservoirs: Research and Management*, 13: 257-269
- Straskraba. 1999. *Retention Time as a Key Variable of Reservoir Limnology*. En: *Theoretical Reservoir Ecology and its Applications* (Eds. J.G. Tundisi & M. Straskraba). International Institute of Ecology, Brazilian Academy of Sciences and Backhuys Publishers, São Carlos, SP: 385-410
- Tundisi, J.G., T. Matsumura-Tundisi & O. Rocha. 1999. *Ecossistemas de águas interiores*. En: *Águas Doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação* (Org. A. da C. Rebouças, B. Braga & J.G. Tundisi). Escrituras Editora, São Paulo: 153-194
- Tundisi, J.G., T. Matsumura-Tundisi & O. Rocha. 1999. *Theoretical basis for reservoir management*. En: *Theoretical Reservoir Ecology and its Applications* (Eds. J.G. Tundisi & M. Straskraba). International Institute of Ecology, Brazilian Academy of Sciences and Backhuys Publishers, São Carlos, SP: 505-528
- Whitton, B. & M. Potts. 2012. *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht