

INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE NITRÓGENO Y FÓSFORO EN EL DESARROLLO DE MICROALGAS DE EMBALSES DEL SUR DE MENDOZA

BALANZA M. E.; ORDÓÑEZ, A.L.; SANTIBAÑEZ M. E.

Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria. Universidad Nacional de Cuyo. Bernardo de Irigoyen 357. San Rafael. Mendoza. mbalanza@fcai.uncu.edu.ar

RESUMEN

Dados los problemas que se han presentado en los últimos años en los embalses sobre el río Atuel de discoloraciones del agua producidas por el desarrollo de microalgas en épocas estivales, sin diferencias significativas del contenido de nutrientes en el agua con los reportados en años anteriores, el presente es un estudio de los requerimientos de nitrógeno y fósforo de las poblaciones de *Tetraselmis*, *Ceratium* y *Fragilaria*, como algas más representativas de los embalses durante las floraciones. Los tres géneros desarrollan bien aún a muy bajas concentraciones de fósforo (0,01 mg/L), siendo las relaciones óptimas de N:P de 30:1; 40:1 y 10:1 respectivamente para los tres géneros mencionados, lo que explica la aparición de las hemotalasias aún cuando se trate de aguas limpias y en embalses calificados como oligo o mesotróficos por su contenido de nutrientes.

1. INTRODUCCIÓN

Los embalses El Nihuil y Valle Grande se ubican sobre el río Atuel, cuyas aguas son utilizadas para el desarrollo socioeconómico del sur de la provincia de Mendoza sobre la base de la agricultura de regadío, generándose los oasis de San Rafael (irrigado también con el río Diamante) y General Alvear y para la generación de energía hidroeléctrica. Además, el agua de estos embalses soporta un considerable uso recreacional, especialmente durante los meses de verano, imprescindible para el desarrollo de las actividades turísticas de fuerte incremento en las últimas décadas.

Los recuentos de formas planctónicas en cualquiera de estos embalses, monitoreados a lo largo de varios años, han sido bajos o muy bajos hasta el año 2000 y no se había reportado la aparición de hemotalasias hasta el verano 2002 – 2003, en que se observaron por primera vez, grandes zonas coloreadas de marrón rojizo en Valle Grande y de verde brillante en El Nihuil. Estos fenómenos se repitieron todos los años hasta el verano 2006 – 2007, durante las épocas más cálidas, aunque con aparente mayor intensidad o superficie afectada cada año.

Una alteración en las condiciones ambientales como contenido de materia orgánica, sales minerales, pH, temperatura, OD, conductividad, etc., puede causar variación en las poblaciones planctónicas, provocando que una ó más especies del plancton se reproduzcan con gran rapidez, alcanzando cifras poblacionales muy elevadas y predominando sobre el resto de los organismos. A este fenómeno se lo conoce comúnmente como floración, bloom ó hemotalasia.

El fenómeno ha sido ampliamente estudiado en hábitats marinos. Sin embargo, la información disponible acerca de las floraciones de agua dulce es escasa. Por esta razón, y en virtud de que algunos tipos de organismos productores de discoloraciones son reconocidos productores de toxinas que podrían afectar la calidad del agua para consumo u otros usos, en trabajos anteriores se ha logrado un monitoreo tanto en la cantidad y tipo de microalgas de los lagos como la cantidad de nutrientes en el agua en las fechas de recolección, incluyendo las zonas y momentos en que aparecieron floraciones algales, con discoloración.

Si bien durante el invierno aparece una mayor diversidad planctónica, durante las épocas más cálidas se ha venido repitiendo una predominancia de las especies que producen las floraciones

en cada caso: en el Embalse de Valle Grande las discoloraciones se producen por el crecimiento de *Ceratium* (Fig. 1a), un dinoflagelado de tamaño importante (más de 300 μm) de color amarroado, por lo que el agua adquiere el cambio de color con densidades relativamente bajas (menos de 500) de células por mL. Durante las épocas más frías se observa una predominancia de la diatomea pennada *Fragilaria* (Fig. 1b), de tamaño mucho menor (unos 100 μm de longitud de cada célula individual, aunque forma colonias de 12 a 20 células). El principal género encontrado en el análisis microscópico de las muestras de agua correspondientes al embalse El Nihuil es la clorófita *Tetraselmis* (Fig. 1c), pequeña (30 μm), de la familia de las Chlamydomonadae, esférica con cuatro flagelos.

Los contenidos de nutrientes no muestran diferencias significativas en los monitoreos de zonas y épocas con y sin hemotalasias, siendo además muy bajos, por lo que podría suponerse que, o bien no existe relación entre el contenido de nutrientes del agua y el excesivo desarrollo fitoplanctónico, o bien se trata de especies que crecen con requerimientos muy bajos de dichos nutrientes, ya que son propias de aguas limpias.

Sin embargo, diversos estudios establecen la influencia de las relaciones nitrógeno : fósforo (N:P) en el crecimiento, estado fisiológico y estructura de la comunidad del fitoplancton (Cuvín-Aralar et al, 2004). Por ejemplo, Egge y Heimdal (1994) mostraron la disminución en la población de diatomeas cuando la relación N:P se incrementa. En otro caso, la comunidad de fitoplancton cambió de especie dominante de *Microcystis* a *Oscillatoria* con la modificación de dicha relación (Takamura et al, 1992).

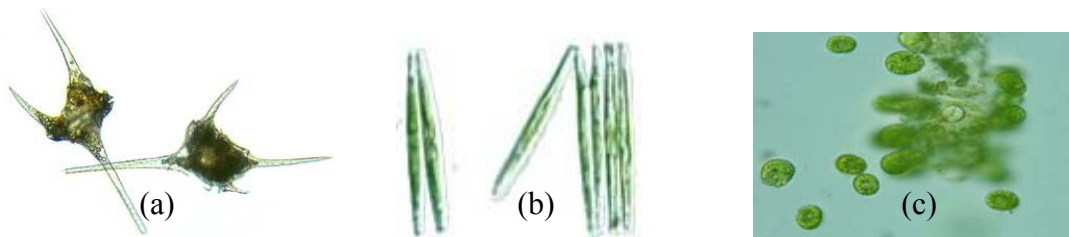


FIG.1 Algas predominantes en hemotalasias de embalses del río Atuel. (a) *Ceratium hirundinella*, (b) *Fragilaria* sp. y (c) *Tetraselmis* sp.

Por otra parte, la importancia relativa de la relación nitrógeno : fósforo como limitante para la producción primaria en sistemas acuáticos (especialmente marinos, sobre los que se dispone de mayor cantidad de investigaciones), ha estado sujeta a controversias en los últimos años (Howarth, 1998; Hecky y Kilham, 1988). Hasta estos autores se consideraba que el nitrógeno era el principal limitante en sistemas acuáticos, requiriéndose relaciones $\text{N:P} \geq 16$ para satisfacer las demandas metabólicas algales, especialmente el fitoplancton (Redfield 1958). Sin embargo, trabajos posteriores encontraron relaciones muy inferiores durante la floración de diversas especies (Boynton et al. 1982; Atkinson y Smith, 1983) y encontraron que muchas de ellas tienen valores óptimos en un rango de relaciones entre 10:1 a 30:1.

Además de ello, diversos trabajos encuentran variabilidad en la toxicidad de algunas algas, especialmente dinoflagelados, en función de diferentes concentraciones y formas químicas del nitrógeno en el medio (Leong et al, 2004; Lomas et al., 2001; Glibert et al, 2001), así como importantes cambios en las ficopoblaciones de aguas dulces poco profundas cuando las relaciones N:P son muy bajas.

2. OBJETIVOS

Dada la situación planteada, el objetivo consistió en determinar la influencia de diversas concentraciones de nitrógeno y fósforo sobre el desarrollo de las especies planctónicas predominantes en los embalses del río Atuel.

3. METODOLOGÍA

Las muestras se obtuvieron a distintas profundidades y tanto de zonas visiblemente afectadas (coloración anormal) como aparentemente limpias de los embalses El Nihuil y Valle Grande en dos épocas del año 2007 dado que las floraciones algales resultaron menores en número e intensidad con respecto a lo ocurrido en años anteriores, presentándose, en consecuencia, las aguas claras la mayor parte del año. Dicha disminución se debió posiblemente a las bajas temperaturas que se registraron durante el invierno en ese año. Los parámetros físico-químicos que se registraron en el momento de extraer la muestra fueron temperatura, transparencia, oxígeno disuelto y pH. Los instrumentos utilizados respectivamente fueron: termómetro, disco de Secchi, Oxímetro y pHmetro

Para determinar el tipo y la concentración de los diferentes organismos del fitoplancton en aguas naturales se utilizó la técnica de filtración por membrana de 0.2 μm . Para aguas claras el volumen filtrado fue de 25 ml y para aguas más coloreadas de 10 ml. Para los cultivos realizados en el laboratorio, los recuentos se realizaron utilizando la cámara de Thoma y un microscopio óptico.

Se aislaron las especies planctónicas de interés por medio del método de siembra en placa, por estría, utilizando medio BRSP nutritivo para algas, solidificado por agar (Stanier *et al.*, 1996). Las colonias seleccionadas se repicaron luego al mismo medio de cultivo sin agar, para la preparación de los cultivos stock, los cuales son necesarios a los efectos de disponer de suficiente volumen de cultivo inicial para sembrar todos los recipientes utilizados en cada prueba con igual número y distribución de células de cada especie a investigar. La incubación se efectuó bajo las mismas condiciones de luz y temperatura en las que se llevaron a cabo los ensayos, durante 7 días.

Una vez obtenidos los cultivos stock, se inocularon los mismos en un volumen de 200 mL (10% del volumen total) en recipientes de plástico transparente de 2 litros de capacidad, mantenidos bajo iluminación artificial durante un período de sesenta días, con agua de pozo esterilizada adicionada de cantidades medidas de N (NaNO_3) y P (K_2HPO_4), según diseño experimental factorial, con diferentes relaciones N:P y dos niveles de P en cada una (0,01 mg/L y 0,05 mg/L). Sólo se repuso en los recipientes el volumen perdido por evaporación o muestreo, con el agua acondicionada según necesidad, logrando una buena homogenización del cultivo.

La medición del desarrollo de microalgas se realizó semanalmente mediante el recuento de células.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Calidad físico química del agua obtenida durante la recolección de muestras:

Del análisis físico-químico de las muestras extraídas tanto del embalse El Nihuil como del embalse Valle Grande se obtuvieron concentraciones de fósforo y nitrógeno que varían desde 0,01 a 0,11 mg / L y 0,38 a 3,00 mg /L respectivamente, con relaciones N:P que van desde 25:1 a 100:1, aún cuando durante el año 2007 no se presentaron discoloraciones, excepto en los primeros meses, correspondiendo al verano 2006-2007. Los valores hallados son concordantes con los obtenidos en estudios anteriores, por lo que la no aparición de elevada concentración de células de los organismos en estudio podría deberse más a la disminución de la temperatura del agua de los lagos que se observó durante el año 2007, a consecuencia de un invierno con temperaturas inusualmente bajas en la zona. La conductividad y el pH promedios de dichas muestras fueron de 1063 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y 7.1, respectivamente. Las determinaciones de Oxígeno disuelto arrojaron una media de 8,5 mg /L y la transparencia de los sitios muestreados varió desde un mínimo de 1,35 m, para zonas con mayor densidad de fitoplancton a un máximo de 3.0 m para zonas de aguas claras. Por último, la temperatura del agua al momento de tomar las muestras se mantuvo entre 15,2°C y 19,4 °C. Estos resultados son concordantes con los

obtenidos en años anteriores, aunque varía la transparencia del agua, que resultó mayor por no haberse detectado las graves floraciones ocurridas durante el año 2006.

4.2 Número y tipo de organismos del fitoplancton.

Las muestras extraídas del embalse El Nihuil en febrero de 2007 mostraron predominancia de células del género *Tetraselmis*, con recuentos de 5000 a 20000 cél / mL en aguas de zonas visiblemente afectadas. Las zonas no coloreadas dieron recuentos de células en un rango mucho menor, de 100 a 2000 cél / mL, aunque manteniendo la predominancia de la clorófito. Los géneros *Ceratium* y *Fragilaria* fueron muy escasos en los recuentos de estas muestras. En las muestras obtenidas después de abril de 2007, la clorófito no aparece o lo hace muy escasamente, obteniéndose una predominancia de diatomeas centrales, aunque con bajo número de células. Se observan algunas células de *Ceratium* en muy bajas densidades celulares (< 1/mL)

Los recuentos de las muestras extraídas del embalse Valle Grande mostraron abundantes células de los géneros *Ceratium* y *Fragilaria*, con predominancia del primero en los primeros meses del año y densidades variables de células, aunque, como ya se dijo, el agua presenta discoloración con concentraciones relativamente bajas del dinoflagelado (500 a 1000 cel/mL) y muy escasas microalgas del género *Tetraselmis*. Durante los meses posteriores, aún durante el invierno, las concentraciones de los dos géneros principales se mantuvieron aproximadamente equivalentes, o con un mayor desarrollo de la diatomea, aunque en ningún momento se obtuvieron muestras negativas para el dinoflagelado, que mantuvo los conteos en un rango de 10 -110 cél /mL.

4.3 Desarrollo según la relación Nitrógeno : Fósforo (N:P).

Los resultados obtenidos en los diferentes cultivos del diseño experimental se muestran en las Tablas 1 y 2 y Fig. 2 a 4

TABLA 1 – Evolución de la concentración de *Tetraselmis*, en células / mL, en cultivos realizados durante 8 semanas con diferentes relaciones N:P y a dos concentraciones de P diferentes. Inóculo: Cultivo stock de células aisladas de embalse El Nihuil

Ide nt.	N : P	P	Tiempo en semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
A1	5N:1P	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	5N:1P	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	10N:1P	0,01	150	130	180	220	250	175	160	170
D1	10N:1P	0,05	280	250	275	580	650	540	580	390
E1	20N:1P	0,01	450	1000	1300	1300	1800	1700	3000	3000
F1	20N:1P	0,05	560	1300	1700	2500	3400	5000	4800	5300
G1	30N:1P	0,01	630	1600	1900	3800	8500	9300	11200	11000
H1	30N:1P	0,05	830	2100	2700	5000	9000	15000	12000	14000
I1	25 N:1P	0,01	520	1200	1500	2600	3500	4300	4600	4600
J1	25 N:1P	0,05	600	890	1500	2900	4800	4850	9300	9050
K1	40N:1P	0,01	590	980	1150	2850	6500	8900	9200	9300
L1	40N:1P	0,05	790	1900	2200	4800	9000	12300	12000	11900

En la Tabla 1 y Fig. 2 se resumen los resultados obtenidos para *Tetraselmis sp.* No se obtuvo desarrollo a las menores relaciones N:P. También es escaso en relaciones 10:1, siendo el mayor desarrollo a las relaciones 30:1 y 40:1, para un nivel de fósforo de 0,05 mg/L. Estos resultados difieren de los obtenidos por Curvin-Aralar et al. (2004), quienes reseñan una relación óptima N:P = 12,5, aunque las especies predominantes en el estudio de estos autores fueron diferentes, dado que presentaban una mayoría de algas verdeazules, propias de ambientes eutroficados y las concentraciones de fósforo también fueron mucho mayores (10 a 25 veces) que las utilizadas en nuestro estudio. Aunque la tabla muestra que las microalgas de El Nihuil desarrollan bien a

altas relaciones N:P, la relación utilizada en el ensayo es menor que las que suelen encontrarse en el agua en forma natural.

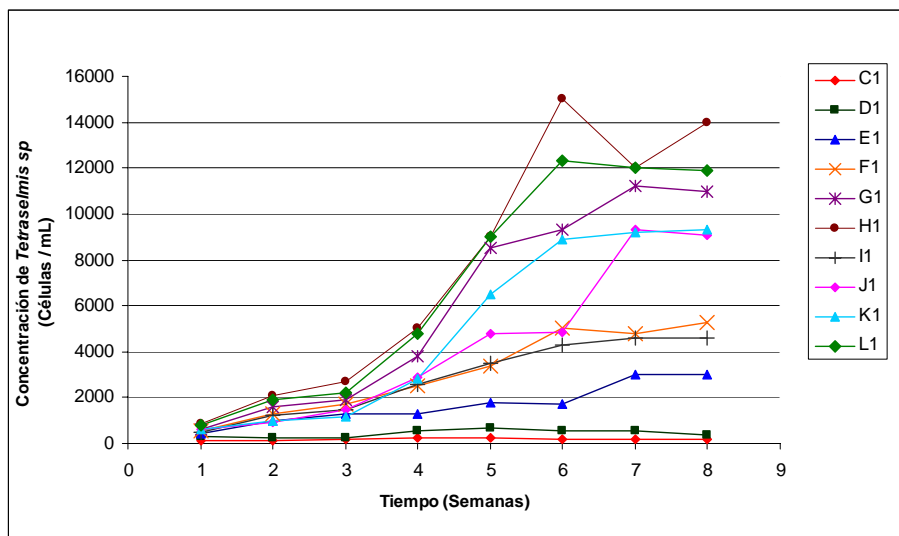


FIG. 2: Crecimiento de *Tetraselmis sp* a diferentes relaciones N:P

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para las algas aisladas de aguas de Valle Grande, cultivadas en conjunto. A bajas relaciones de nutrientes no se obtuvo desarrollo de las algas que suelen presentarse en forma predominante tanto durante los meses fríos como en los cálidos en el embalse de referencia, aunque sí pudo observarse algún crecimiento de la diatomea central *Ciclotella*, presente durante todo el año en el agua del río Atuel.

TABLA 2 – Evolución de la concentración de *Ceratium* y *Fragilaria*, en células / mL, en cultivos realizados durante 8 semanas con diferentes relaciones N:P y a dos concentraciones de P diferentes. Inóculo: Cultivo stock de células aisladas de embalse Valle Grande.

Id.	N : P	Especie	Tiempo en semanas							
			1	2	3	4	5	6	7	8
A2	5:1 P 0,01	<i>Ceratium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Fragilaria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	5:1 P 0,05	<i>Ceratium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Fragilaria</i>	30	28	32	48	45	54	48	50
C2	10:1 P 0,01	<i>Ceratium</i>	17	15	22	36	30	47	45	36
		<i>Fragilaria</i>	30	32	38	48	45	64	65	60
D2	10:1 P 0,05	<i>Ceratium</i>	18	22	35	38	56	98	108	95
		<i>Fragilaria</i>	35	56	75	98	88	92	96	84
E2	20:1 P 0,01	<i>Ceratium</i>	58	85	98	150	198	180	220	200
		<i>Fragilaria</i>	28	34	35	30	30	25	24	18
F2	20:1 P 0,05	<i>Ceratium</i>	70	120	150	220	250	275	230	270
		<i>Fragilaria</i>	28	30	28	26	30	38	26	24
G2	30:1 P 0,01	<i>Ceratium</i>	96	115	110	168	320	350	400	380
		<i>Fragilaria</i>	18	22	26	24	32	26	22	20
H2	30:1 P 0,05	<i>Ceratium</i>	180	250	275	380	550	540	580	450
		<i>Fragilaria</i>	20	28	30	26	28	18	22	22
I2	25:1	<i>Ceratium</i>	60	92	95	150	230	310	450	450
J2	25:1	<i>Ceratium</i>	90	150	180	175	360	490	500	510
K2	40:1	<i>Ceratium</i>	92	150	280	360	340	440	500	480
L2	40:1	<i>Ceratium</i>	210	230	360	390	590	690	650	680

Las densidades celulares absolutas son mucho menores para estas especies que las encontradas para las algas de El Nihuil, pero el dinoflagelado *Ceratium*, por su gran tamaño, suele proporcionar coloraciones al agua con cantidades de células por mililitro similares a las encontradas en este estudio.

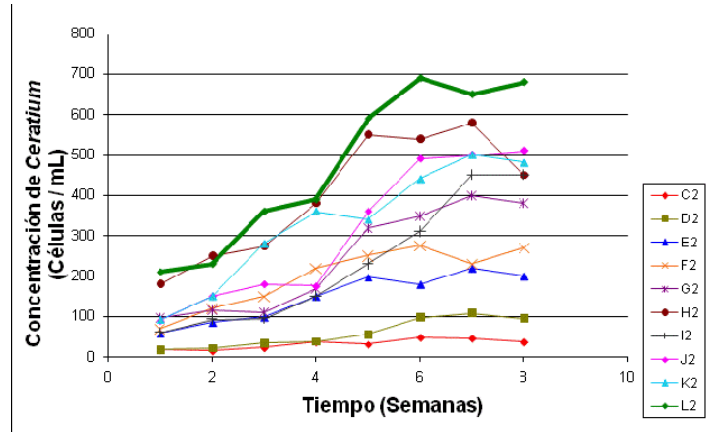


FIG. 3: Crecimiento de *Ceratium* sp a diferentes relaciones N:P

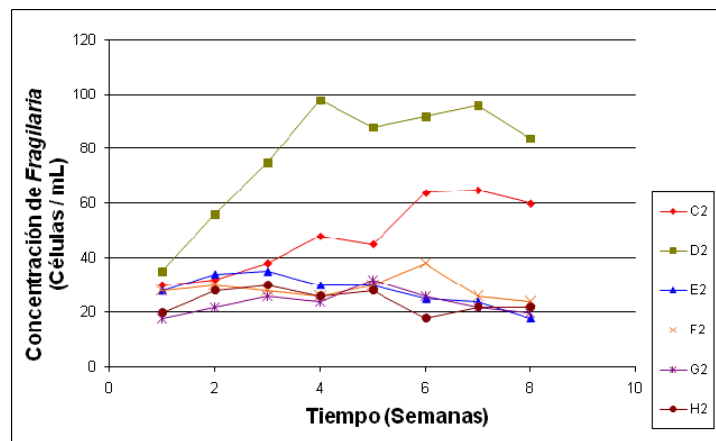


FIG. 4: Crecimiento de *Fragilaria* sp a diferentes relaciones N:P

Por otra parte, la diatomea *Fragilaria*, no sólo crece mejor que el dinoflagelado a menores relaciones N:P = 10:1 (Fig 4), sino que también parece haber un efecto de competitividad cuando *Ceratium* tiene mejores condiciones para su crecimiento al aumentar las relaciones N:P, como se muestra en la Fig. 3. Sin embargo, ambos géneros muestran mejor desarrollo cuando las concentraciones de fósforo son mayores (P 0,05)

5. CONCLUSIONES

Las especies de algas aisladas tanto de El Nihuil como de Valle grande muestran importante crecimiento aún con las menores concentraciones de fósforo, y con altas relaciones de nitrógeno : fósforo.

Las concentraciones de nutrientes en las que se obtuvo buen desarrollo, se encuentran muy por debajo de la media en el agua natural de los embalses, especialmente la concentración del fósforo, por lo que es posible que estas algas crezcan en las condiciones naturales de los lagos, aún cuando éstos muestren características de aguas limpias, por la influencia de algún otro

factor no ensayado, como por ejemplo, la temperatura del agua o una combinación de temperatura y radiación solar.

BIBLIOGRAFÍA

- Atkinson, M., y S. Smith. 1983. C: N: P ratios of benthic marine plants. *Limnol. Oceanogr.* 28: 568-574.
- Boynon, W., W. Kemp, y C. Keefe. 1982. A comparative analysis of nutrients and other factors influencing estuarine phytoplankton production, p. 69-90. In V. Kennedy [ed.], *Estuarine comparisons*. Academic.
- Cuvin-Aralar, M.L.; Focken, U.; Becker, K; and Aralar, E.V. 2004. Effects of low nitrogen-phosphorus ratios in the phytoplankton community in Laguna de Bay, a shallow eutrophic lake in the Philippines. *Aquatic Ecology* 38: 387-401.
- Egge J.K. and Heimdal B.R. 1994. Blooms of phytoplankton including *Emiliana huxleyi* (Haptophyta) – Effects of nutrient supply in different N-P ratios. *Sarsia* 79: 333-48
- Hecky, R. E., y P. Kilham. 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: A review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnol. Oceanogr.* 33: 796-822.
- Howarth, R. W. 1988. Nutrient limitation of net primary production in marine systems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 19: 89-110.
- Leong, S.C.Y., Taguchi, S., 2004. Response of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* to a range of nitrogen sources and concentrations: growth rate, chemical carbon and nitrogen, and pigments. *Hydrobiologia* in press.
- Lomas, M.W., Glibert, P.M., Clougherty, D.A., Huber, D.R., Jones, J., Alexander, J., Haramoto, E., 2001. Elevated organic nutrient ratios associated with brown tide algal blooms of *Aureococcus anophagefferens* (Pelagophyceae). *J. Plank. Res.* 23, 1339-1344.
- Martinez M.R., Chakroff R.P. and Pantastico J.B. 1975. Direct phytoplankton counting techniques using the haemocytometer. *Phil. Agric.* 59: 43-50.
- Pantastico J.B., Baldia J.P., Baldia S.F., Reyes D.J., and Gonzal A. 1986. Isolation and cultivation of *Anabaena* sp. from organic media after sterilization. *Phil. Agric.* 69: 645-654.
- Redfield, A. C. 1958. The biological control of the chemical factors in the environment. *Am. Sci.* 46: 205-230.
- Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P.R. (1996). *Microbiología*. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España, pp. 18-21.
- Takamura, N.; Otsuki, A.; Aizaki, M. and Nojiri, Y. 1992. Phytoplankton species shift accompanied by transition from nitrogen dependence to phosphorus dependence of primary production in Lake Kasumigaura, Japan. *Arch. Hydrobiol.* 124:129-148.