FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO ACADEMICO DE
INGENIERO EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

"DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO NECESARIA PARA BIOENSAYOS DE LIMITACIÓN DE NUTRIENTES EN ALGAS DE LA LAGUNA DON TOMÁS"

MARCELO R. CASANOVAS

SANTA ROSA (LA PAMPA) ARGENTINA

2008

Prefacio

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Ingeniero en Recursos Naturales y Medio Ambiente de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Recursos Naturales dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa, durante el período comprendido entre el 26 de febrero de 2008 y el 3 de julio de 2008, bajo la dirección del Dr. Pilati, Alberto.

Agradecimientos

Estoy profundamente agradecido a mi director Alberto Pilati por su guía y dedicación de tiempo durante mi aprendizaje del método científico.

Agradezco a Susana Álvarez y a Alejandrina Trucco por haber brindado información valiosa sobre la composición algal de la laguna Don Tomás; a la Dra. María C. Martín, a Vanina Bolaño y Jaime Bernardos por brindar ayuda en los procesos estadísticos.

Y por último, a mi familia y a Mirta por sus esfuerzos y "aguante" para que logre éste titulo, mí más sentido agradecimiento. A todos ¡muchas gracias!

03/07/2008 ……

Departamento de Recursos Naturales

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Resumen

La eutrofización es un proceso de aumento en la producción del sistema dado por un aumento desmesurado de nutrientes. Particularmente, en cuerpos de agua dulce, este aumento en la producción se debe a importantes aportes de nitrógeno (N) y fósforo (P). La manera de saber cuál es el nutriente específico que produce esta eutrofización es mediante bioensayos de limitación de nutrientes. Para ésto, existen protocolos muy utilizados en EEUU para cuerpos de agua eutróficos que agregan determinadas concentraciones de N y P. Sin embargo, estas concentraciones no producen el efecto deseado en cuerpos pampásicos de la República Argentina (hipereutróficos) que poseen una mayor cantidad de algas, por lo que es necesario agregar más nutrientes para obtener una respuesta significativa.

En el presente estudio se llevó acabo un bioensayo de limitación de nutrientes con el objetivo de ajustar protocolos de bioensayos algales para las condiciones hipereutróficas locales. Este estudio se realizó en la laguna Don Tomás de la ciudad de Santa Rosa, provincia de La Pampa. Los resultados indican que la limitación algal aumenta linealmente a bajas concentraciones de nitrógeno hasta llegar a un umbral a partir del cual no se observan cambios. Este umbral corresponde a 6mg de nitrato de amonio por litro y 1.42 mg de fosfato de sodio monobásico; concentraciones mínimas que producen un crecimiento máximo balanceado en la comunidad algal.

Abstract

Eutrophication is the increased growth of the biota of lakes due to an increased input of nutrients. In the case of fresh water bodies this process is usually due to a significant increase in the inputs of nitrogen (N) and phosphorous (P). Nutrient limitation bioassays are used to determine which is the specific nutrient generating the eutrophication process. Different protocols are being used in the US in eutrophic lakes which add N and P in specific concentrations. However, these concentrations do not produce the expected effect in water bodies from the Pampa region of Argentina (hipereutrophic) because these lakes have higher amount of algae. Therefore a higher amount of nutrient is needed to produce a significant response.

In this study, I adjusted a nutrient limitation bioassay to local lake's hipereutrophic conditions. The study was carried out with water from Don Tomás lake, Santa Rosa, La Pampa province. The results indicated that algal limitation increased linearly at low N concentrations. Then, a threshold is reached, after wich no changes were observed. This threshold corresponds to 6 mg ammonium nitrate per liter and and 1.42 mg sodium phosphate monobasic; minimum concentrations that resulted in a maximal balanced growth of the algal community.

Índice

Prefacio	2
Resumen	3
Introducción	6
Área de estudio	9
Materiales y métodos	10
Resultados y discusión	11
Conclusión	17
Bibliografía	18

Introducción

La eutrofización es un proceso de aumento en la producción del sistema dado por un aumento desmesurado de nutrientes tales como el nitrógeno (N) y el fósforo (P). Estos aportes estimulan el crecimiento y proliferación de algas las cuales tienen efectos negativos en los cuerpos de agua desde un punto de vista ecológico como mortandad de peces provocados por toxinas algales (Álvarez com. pers.); así como también malos olores, turbiedad, etc. características típicas de cuerpos eutróficos observados en otros lugares del mundo (Lampert y Sommer. 1997, Carpenter *et al.* 1998).

El crecimiento algal está íntimamente relacionado con los requerimientos de nutrientes y la disponibilidad de los mismos. En los lagos, el principal factor limitante es el fósforo (Schindler, 1974). Los aportes de este elemento procedentes de abonos y detergentes hacen que el P pierda su efecto limitante, siendo utilizado por el fitoplancton, cuyas poblaciones crecen desmesuradamente hasta agotar el N (www.fcyt.umss.edu.bo/docentes/29/practicas/practica5.pdf).

La respuesta algal a la adición de ciertos nutrientes se puede estudiar a través de dos técnicas diferentes. La primera es mediante el uso de proporciones fijas de carbono, nitrógeno y fósforo establecidas para las algas. Goldman, *et al.* (1979) descubrieron que el fitoplancton tiene una relación estequiométrica Carbono: Nitrógeno: Fósforo de 106:16:1 átomos. Esta razón es conocida como la razón de Redfield e implica que el fitoplancton no estará ni limitado por el N ni por el P cuando el N y el P disponibles están a una razón de 16: 1 átomos. Si este cociente fuera menor a 16:1 implica que el fósforo está en abundancia por lo tanto las algas estarán limitadas por nitrógeno (Lampert y Sommer, 1997). Caso contrario, las algas estarían limitadas por P.

La segunda técnica es mediante bioensayos de crecimiento algal. Estos experimentos son usados para determinar el grado de limitación de un nutriente en una muestra particular de agua (Downing *et al.* 1999). Los experimentos se corren por un período de 48 hs, en el cual el fitoplancton del lago es cultivado con y sin nutrientes y se estudia cual es el nutriente que produce mayor respuesta algal (nutriente limitante).

En esta tesina se define la limitación por nutrientes como "el cambio en la tasa de crecimiento por unidad (gramo, unidad de carbono o clorofila) de una comunidad algal posteriores a la saturación de nutrientes (Osenberg and Mittelbach 1996). En otras palabras es el crecimiento algal reducido por falta de un nutriente esencial generalmente N o P

(Downing *et al.* 1999). Esta definición de limitación de nutrientes presume que los nutrientes fueron agregados en exceso.

La cantidad de nutrientes agregados varían entre los estudios, pero los nutrientes fueron usualmente agregados en gran exceso en comparación al rango de concentraciones observadas en el ecosistema (Downing 1997). Consecuentemente, estos experimentos miden cuanto se aleja el crecimiento algal de una situación óptima con saturación de nutrientes. Si los nutrientes no se proveyeran por encima de los niveles de saturación los estudios de la limitación serían subestimados.

Existen bioensayos de limitación de nutrientes realizados en lagos eutróficos de EE.UU. que agregan determinadas cantidades de N y P (Vanni *et al.* 2006). En la Republica Argentina, y particularmente para la provincia de La Pampa, no se han encontrado registros de bioensayos de limitación por nutrientes. Estudios preliminares realizados en la laguna Don Tomás (Pilati, A. inédito) indican que si se agregan las concentraciones de nutrientes establecidas en este protocolo no se observan diferencias significativas entre N y P (A. Pilati com. pers.). Sin embargo, si se utilizan concentraciones mayores se observa una fuerte limitación por N. Esto se debe a que la laguna Don Tomas presenta condiciones de hipereutrofia mucho más altas que las presentes en lagos eutróficos de EEUU, como el caso del lago Acton. Este cuerpo de agua, es un reservorio eutrófico que posee una cuenca con 80 % de su superficie ocupado por actividad agrícola (Knoll *et al.* 2003). Los niveles de clorofila promedian los 56 µg/l y el fósforo total 130 µgP/l (Knoll *et al.* 2003). Sin embargo, la laguna Don Tomás posee una concentración de clorofila de 155 µg/l y una concentración de fósforo total de 9.71 mg/l (Echaniz *et al.* en revisión). Esto implica que la densidad algal de la laguna Don Tomás es más del doble que el lago Acton y el fósforo total es 74 veces más alto por lo que sus algas necesitarán más nutrientes disueltos para producir una respuesta semejante a la que se obtiene en el lago Acton. Sin embargo, se desconoce cual es la concentración mínima necesaria para la cual se obtiene la máxima respuesta de crecimiento algal, por lo que deben adaptarse estos protocolos estadounidenses a la realidad de los cuerpos de agua de la provincia de La Pampa.

El objetivo principal de esta investigación es determinar el umbral de concentración de Nitrógeno (como Nitrato de Amonio) en el cual el crecimiento algal se hace máximo, para un cuerpo hipereutrófico como lo es la laguna Don Tomás.

Particularmente se hipotetiza que "<u>la relación entre la concentración de Nitrógeno y la respuesta algal no es una línea recta</u>" (Fig. 1).

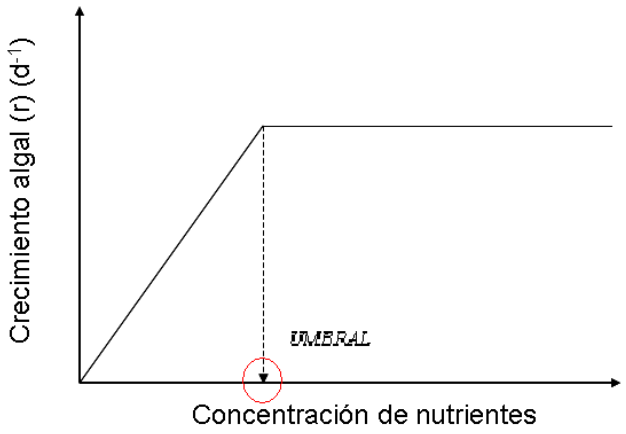

Figura 1: Relación hipotética entre la concentración de nutriente y el crecimiento algal.

En la Figura 1 se observa como la relación entre la concentración de nutrientes y el crecimiento algal se estabiliza en un valor. El aumento de la respuesta algal a bajas concentraciones de nutrientes es lineal debido a que aún no han alcanzado su máximo crecimiento potencial. Donde la respuesta algal se hace máxima indica que llegamos a un umbral de concentración de nutrientes (concentración mínima a la cual se obtiene una respuesta determinada). Una vez superado el mismo se espera que el crecimiento de la comunidad algal se mantenga estable frente a nuevas adiciones de nutrientes como consecuencia de que la comunidad algal llegó a su crecimiento máximo promedio.

Los bioensayos de limitación de nutrientes constituyen una herramienta de suma importancia para determinar cual es el elemento que limita el crecimiento del fitoplancton. De esta manera se puede establecer cual es el nutriente en abundancia que se debería regular o controlar para lograr la recuperación del cuerpo de agua a su estado original.
La determinación de las concentraciones que se deben usar dadas las condiciones locales de la laguna Don Tomás permitirá ajustar los mismos a las condiciones locales y constituirá la primera publicación sobre limitación de nutrientes en la provincia de La Pampa.

Área de estudio

La laguna Don Tomás es un cuerpo de agua somero ubicado al oeste de la ciudad de Santa Rosa (64° 19'03'' W, 36°37'20'' S). El área lagunar abarca aproximadamente 135,2 has y la profundidad puede llegar hasta los 2,3 m. El desarrollo de la línea de costa representa un contorno muy regular casi sin accidentes (Echaniz *et al*. en prensa). Circundante a la misma se ubica un complejo de importancia recreativa que reviste interés tanto por su paisaje como por la pesca que se desarrolla en la misma. Constituye un verdadero receptor de los desagües pluviales proveniente de esta ciudad, lo que permite, en la actualidad, que sea permanente (Echaniz *et al*. en prensa).

La laguna Don Tomás se comportó como cuenco receptor de los desagües cloacales provenientes de los piletones de tratamientos ubicados al norte de la ciudad hasta 1987 cuando estos desagües fueron derivados al bajo Giuliani (Marani com. pers). Esos desagües aportaron grandes cantidades de N y P que hicieron que este cuerpo lagunar se comporte, junto a otros factores, como hipereutrófico (Echaniz *et al.* en prensa) según el índice de Carlson (1977). Esta laguna presenta altos niveles N y P totales, con 11.52 mg/l y 9.71 mg/l respectivamente y su condición hipereutrófica favorece el crecimiento desmedido del fitoplancton. Los niveles de N disuelto de 7.8 µg N/L y 13.05 µg P/L (Trucco, com. pers.) arrojan una razón molar N:P de 1.3:1 lo cual es menor a 16:1 por lo que se infiere que las algas de la laguna Don Tomás tienen una gran abundancia de P y su crecimiento estaría limitado por el N.

La transparencia del agua típica es de 0,15 m aproximadamente. Según lo propuesto por Kimmel *et al.* (1990) para lagos someros y embalses, los aportes pluviales que llegan a la Laguna Don Tomás también podrían aliviar directamente la limitación de nutrientes, debido a que éstos aportarían importantes cantidades de N y P.

El contenido de clorofila medido por el método de acetona en frío dio un valor de 91,2 µg/L para las muestras obtenidas de la zona eufótica del cuerpo lagunar en el mes de febrero de 2008. La riqueza específica de algas encontrada en la Laguna Don Tomás al momento de los bioensayos estuvo igualmente representada por especies algales correspondientes a las divisiones Bacillariophyta, Cyanophyta, y Chlorophyta (Fig. 2). La especie que dominó en la muestra fue *Planktotrix agardii* (Cyanophyta) (A. Trucco y S. Álvarez, com. pers).

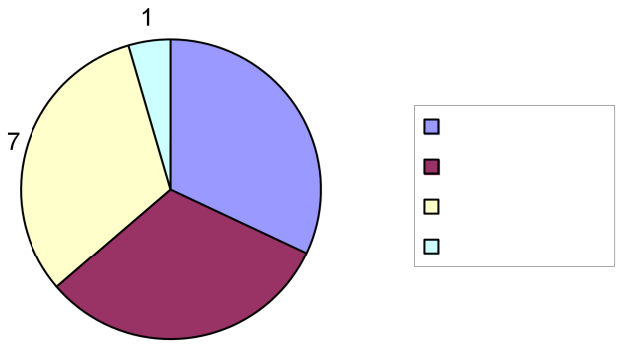

Figura 2: Riqueza específica de las algas presentes en la Laguna Don Tomás en Febrero de 2008.

Materiales y métodos

Para determinar la concentración de nitrógeno para la cual el crecimiento algal es máximo, se tomaron muestras procedentes de la zona eufótica de la laguna Don Tomás el 26 de febrero de 2008. En el laboratorio se procedió al filtrado del zooplancton utilizando una red de 63 micrones. La razón por la cual se realizó este filtrado es para evitar que el zooplancton interfiera en la población de fitoplancton mediante pastoreo y reduzca las mediciones de clorofila. Luego se llenaron los Erlermeyer con 175 ml del agua libre se zooplancton.

Se realizaron 2 tratamientos: Control (sin aplicación de nutrientes, n=6) y Nitrógeno (6 concentraciones de Nitrato de Amonio, n=3). La primera concentración que se forma en los Erlermeyer es de 2 mg de nitrato de amonio que corresponde a la utilizada por Vanni *et al.* (2006) para lagos eutróficos de Ohio (EEUU).

Los Erlermeyer se incubaron por 48 hs en una cámara de cultivo a una temperatura de 27 grados centígrados y un ciclo de 14 hs de luz y 10 de oscuridad. Las incubaciones se hicieron bajo tubos fluorescentes que emiten 350 µmoles PAR/ m2. seg.

Pasadas las 48 hs de incubación se midió la clorofila *in vivo* utilizando un Fluorómetro de mano Aquafluor de Turner Designs. La severidad de la limitación algal por N se determinó usando la siguiente fórmula (Downing *et al.* 1999):

$$\Delta \text{ Tratamiento} = LN\,(Chl_{tratamiento} / Chl_{control})/\text{tiempo}$$

Luego se construyó un gráfico con la concentración de nutriente en las abscisas y la severidad de la limitación en el eje de las ordenadas. Este gráfico me permitió determinar gráficamente la concentración a partir de la cual las respuestas algales son similares.

Para testear si la relación entre la concentración de nutrientes y la respuesta algal es lineal, se ajustaron dos modelos de regresión (lineal y logarítmica) utilizando Microsoft Excel. Para determinar estadísticamente la concentración a partir de la cual no existen variaciones en la respuesta algal, se utilizó un test de Tukey HSD con el software estadístico JMP SAS 7.0 para testear que las respuestas algales no difieran entre si (Zar, 1996).

Resultados y Discusión

Las adiciones de nitrato de amonio produjeron los efectos deseados sobre la comunidad algal. Era notable a simple vista las diferencias en la coloración que presentaban las muestras formando un gradiente de coloración verde que iba desde el color verde más claro (en el control) hasta el verde más oscuro (en las muestras con mayores concentraciones de nutrientes).

El crecimiento algal (como fluorescencia de clorofila *in vivo*) también fue en aumento conforme se incrementaba la concentración de nitrato de amonio en las muestras hasta llegar a una concentración en la cual la respuesta algal se hizo máxima y a partir de la cual no se evidenciaron incrementos en la cantidad de clorofila con las posteriores adiciones de N. (Fig.3)

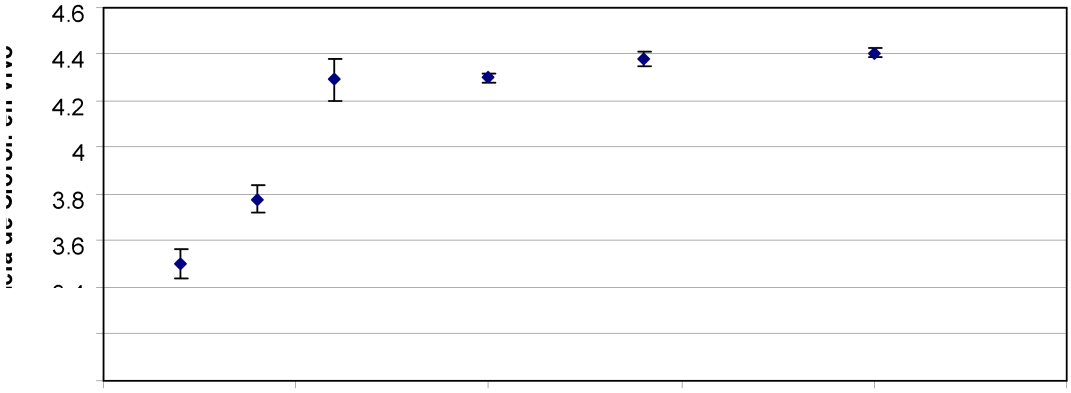

Figura 3: Variación de la clorofila *in vivo* de una comunidad algal de la Laguna Don Tomás, en función de las concentraciones de nitrato de amonio. Las barras de error representan la desviación estándar (n=3).

Este tipo de crecimiento es muy común entre los seres vivos y sigue la relación más simple del crecimiento vs. nutrientes descriptos por Monod (1950) que relaciona la tasa de crecimiento (μ) a la concentración ambiental de nutriente limitante (S).

$$\mu = (\mu max * S)/(S + k_s)$$

Donde μ_{max} es la tasa máxima de crecimiento y k_s la constante de saturación media. La curva resultante de esta fórmula típicamente tiene un incremento lineal o casi lineal a bajas concentraciones y luego crece asintóticamente cuando cambia de limitación a saturación (Sommer 1986; Lampert y Sommer 1997).

Posteriormente, se calculó el índice de severidad de la limitación por nitrógeno en la comunidad algal (Δr). Con el objetivo de verificar si es posible explicar el crecimiento algal en función de la concentración de nutrientes se aplicó un análisis de regresión de los datos. En el primer modelo se aplicó un análisis de regresión simple a los datos originales (Fig. 4). Este modelo rechaza Ho: $\beta=0$ ($F_{1, 17}=25.44$, $P=0.0001$) y explica un 61% de la variación (Tabla 1). Posterior a la aplicación de este modelo se testeó la normalidad de los residuos utilizando dos estadísticos. Tanto el test de Kolmogorov – Smirnov (D= 0.1343, p= n.s) como el de Shapiro – Wilk (W=0.9716, p=0.827) indicaron normalidad de los residuos.

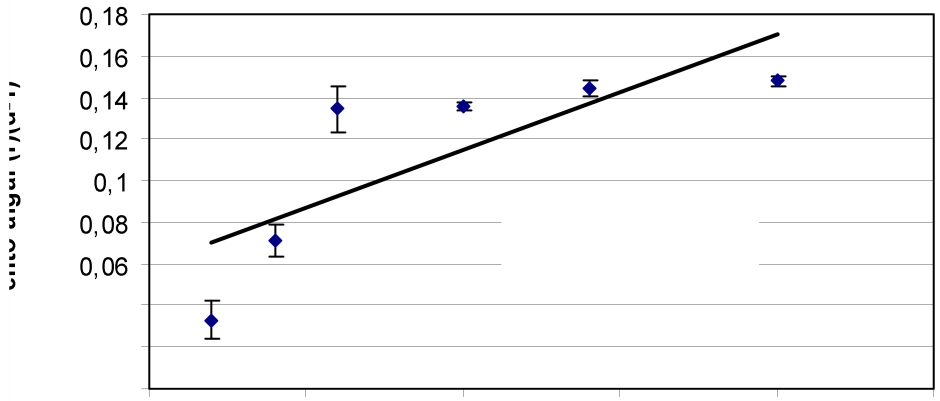

Figura 4: Gráfico de dispersión de la variación del crecimiento algal bajo diferentes concentraciones de nitrato de amonio. La recta indica la regresión lineal simple entre las variables. Los errores para cada concentración representan las desviaciones estándar (n=3).

Tabla 1: Análisis de la Varianza para una regresión simple entre la concentración de nitrato de amonio (variable independiente) y la respuesta algal (variable dependiente) en los datos originales. g.l.= grados de libertad, S.C.= suma de cuadrados, C.M.= cuadrados medios, F= estadístico.

	g.l.	S.C.	C.M.	F
Regresión	1	0.0212236	0.021224	25.4414
Error	16	0.0133474	0.000834	P=0.0001
Total	17	0.0345711		

El segundo modelo consistió en un análisis de regresión simple previa aplicación de logaritmo a las concentraciones (Fig.5). Este segundo modelo también rechazó Ho: $\beta=0$ ($F_{1,17}=85.51$, $P<0.0001$) pero explica hasta un 84% de la variación (Tabla 2). Sus residuales

también siguen una distribución normal (Kolmogorov – Smirnov D=0.1631, P= n.s; Shapiro – Wilk W=0.9006, P=0.059).

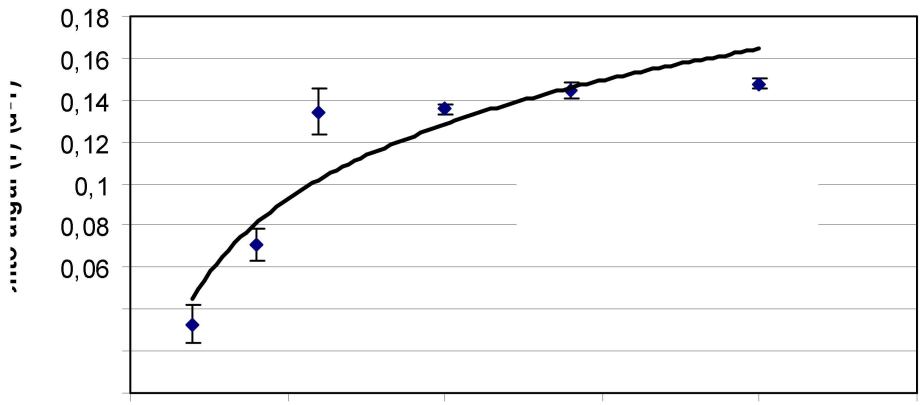

Figura 5: Gráfico de dispersión de la variación del crecimiento algal bajo diferentes concentraciones de Nitrato de amonio. La línea indica la regresión logarítmica entre las variables. Los errores para cada concentración representan las desviaciones estándar (n=3).

Tabla 2: Análisis de la Varianza para una regresión simple en datos logarítmicos entre la concentración de nitrato de amonio (variable independiente) y la respuesta algal (variable dependiente) g.l.= grados de libertad, S.C.= suma de cuadrados, C.M.= cuadrados medios, F= estadístico.

	g.l.	S.C.	C.M.	F
Regresión	1	0,0291222	0,029122	85,5133
Error	16	0,0054489	0,000341	P‹0,0001
Total	17	0,0345711		

De la comparación de estos dos modelos se concluye que si bien existe relación directa entre ambas variables, ésta no es lineal, explicando el segundo modelo (logarítmico) un mayor porcentaje de la variación.

Para determinar la concentración a partir de la cual las algas adquieren una tasa máxima de crecimiento se aplicó un ANOVA a las diferentes respuestas algales (Tabla 3). El ANOVA realizado entre los tratamientos mostró que existen diferencias significativas en las respuestas algales frente a la adición de nitrato de amonio.

Tabla 3: Análisis de la Varianza de un solo factor (concentración de nutrientes) para la variable "crecimiento algal".

	g.l.	S.C.	C.M.	F
Modelo	5	0,0336869	0,006737	128,5624
Error	12	0,0006288	0,000052	$P<0,0001$
Total	17	0,0343157		

En la Figura 3 se observa un incremento casi lineal del crecimiento algal a bajos valores de nitrato de amonio. Esto indica que las algas están limitadas por este nutriente, y si se realizara un experimento de limitación por nutrientes a estas concentraciones no se obtendría una respuesta algal máxima (Downing *et al.* 1999) por lo que podríamos estar subestimando la severidad por cierto nutriente.

Para determinar estadísticamente el punto de inflexión de la curva (concentración mínima de nutriente que produce una respuesta máxima) se efectuó un Test de Tukey de comparación múltiple de medias. Este mostró que la concentración de 6 mg NH_4 NO_3/L constituye un valor umbral a partir del cual el crecimiento de la comunidad algal no manifiesta incrementos significativos (Fig. 6).

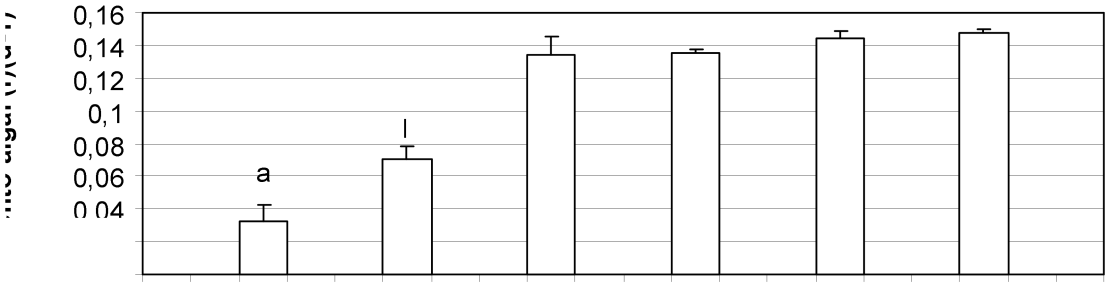

Figura 6: Test de comparación múltiple de medias (Tukey) para el crecimiento de una comunidad algal (r) bajo diferentes concentraciones de nitrato de amonio. Se indican las medias (n=3) y las desviaciones estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos (P<0,05).

Este umbral de 6 mg de nitrato de amonio por litro es tres veces más alto que las concentraciones usadas por Vanni *et al* (2006) al para lagos eutróficos de Ohio, EEUU. Esto no es sorprendente teniendo en cuenta que la densidad algal (como clorofila) en la laguna Don Tomás (91,22 µg/l ± 1.7 DE) representa aproximadamente el doble que la clorofila de estos lagos eutróficos de Ohio, EEUU (56 µg/L) (Knoll *et al.* 2003). De esta manera analizando sólo la clorofila, se infiere que se necesitarían, como mínimo, el doble de nitrato de amonio que el usado por Vanni *et al.* (2006).

Sin embargo, las algas también necesitan Fósforo para crecer, otro nutriente altamente limitante en ecosistemas acuáticos (Schindler 1975; Elser *et al.* 1990). En el fitoplancton, el N y el P se encuentran en una relación ya establecida llamada razón de Redfield. De acuerdo a esta relación, en las algas se encuentran 16 átomos de nitrógeno por cada 1 átomo de fósforo (N:P molar = 16:1). De esta manera se utilizó esta relación para estimar la proporción de P equivalente al nivel de N encontrado que favorezca un crecimiento

balanceado. Para esto, se estimó que una concentración de 6 mg de Nitrato de amonio por litro posee 2,1 mg de nitrógeno, lo que equivale a 0,15 mM de N. De acuerdo a la relación de Redfield esto equivale a 0.009 mM de fósforo. Para determinar los mg de P correspondientes se multiplico este valor por el peso atómico del fósforo y se obtuvo 0,279 mg P. Estos mg de fósforo estarían contenidos en una solución final de 1,242 mg de NaH_2PO_4 x H_2O por litro.

Conclusión

Los resultados obtenidos me permitieron respaldar la hipótesis de que la relación entre la concentración de nitrato de amonio y el crecimiento algal no es lineal. Esto es que el crecimiento algal va en aumento conforme se incrementaba la concentración del nutriente hasta llegar a un valor umbral a partir del cual el crecimiento no manifiesta cambios. Los experimentos realizados permitieron determinar que la concentración umbral de 6 mg de nitrato de amonio por litro produce un crecimiento máximo promedio de 0,14 d^{-1}. De esta manera se sugiere que en experimentos de limitación por nutrientes (N y P) para la comunidad algal de la laguna Don Tomás, se utilicen concentraciones finales de 6mg de nitrato de amonio por litro y 1,242 mg de fosfato de sodio monohidratado por litro para asegurar un crecimiento balanceado y una máxima respuesta algal.

Bibliografía

Carlson, R. E. 1977. A trophic state index for lakes. Limnol. Oceanogr. 22:361-369

Carpenter, S.R., N. F. Caraco, D. L. Correll, R. W. Howarth, A.N. Sharpley, y V.H. Smith. 1998. Non point pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. Ecol. Applic. 8(3):559-568.

Downing, J. A. 1997. Marine nitrogen: phosphorus stoichiometry and the global N: P cycle. Biogeochemistry 37: 237-252.

Downing, J. A., C. W. Osenberg y O. Sarnelle. 1999. Metaanalisis of marine nutrient enrichment experiments: variation in the magnitude of nutrient limitation. Ecology 80(4):1157-1167.

Echaniz, S. A., A. M. Vignatti y P.C. Bunino. El zooplancton de un lago somero hipereutrófico de la región central de Argentina. Cambios a lo largo de una década. Biota Geotrópica. En prensa

Elser, J. J., E. R. Marzolf, y C. R. Goldman. 1990. Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in the freshwaters of North America: A review and a critique of experimental enrichments. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47:1468-1477.

Goldman, J. C., J.J. McCarthy, D. G. Peavey. 1979. Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. Nature 279: 210-215.

Kimmel, B. L., Lind, O. T. y Paulson, L. J. 1990. Reservoir primary production. In: Thorton, K. W., Kimmel, B. L. y Payne, F. E., (Eds): Reservoir limnology: ecological perspectives. New York. John Wiley y Sons, pp. 133-193.

Knoll, L. B., M. J. Vanni and W. H. Renwick. 2003. Phytoplancton primary production and photosynthetic parameters in reservoirs along a gradient of watershed land use. Limnol. Oceanogr. 48(2): 608-617.

Lampert, W. y U. Sommer. 1997. Limnoecology: The ecology of lakes and streams. Oxford University press 382 pp.

Monod, J. (1950). La technique de la culture continue: theories et applications. Ann Inst Pasteur Lille 79:390 – 410.

Osenberg, C. W., and G. G. Mittelbach. 1996. The relative importance of resource limitation ad predator limitation in food chains. Paginas 134 – 148. En G. A. Polis

and K. O. Winemiller, editors. Food webs: integration of patterns and dynamics, Chapman y Hall, New York, New York, USA.

Schindler, D. W. 1975. Whole lake eutrophication experiments with phosphorus, nitrogen and carbon. Verh. Int. Ver. Limnol. 21:65-80.

Schindler, D.W. 1974. Eutrophication and recovery in experimental lakes: implications for lake management. Science 184:897-899.

Sommer, U. 1986. Phytoplancton competition along a gradient of dilution rates. Oecologia 68: 503 – 506.

Vanni, M.J., S. Andrews, W. H. Renwick, M. J. Gonzalez, y S. Noble. 2006. Nutrient and light limitation of reservoir phytoplankton in relation to storm mediated pulses in stream discharges. Arch. Hydrobiol. 167(1-4):421-445.

Zar, J. H. 1996. Biostatistical analysis. Third Edition. Prentice Hall. 662 pp.