

**DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL TÓXICO DE CIANOBACTERIAS NOSTOCALES Y
CHROOCOCCALES EN LA COLUMNA DE AGUA DEL EMBALSE RIOGRANDE II
(ANTIOQUIA) A TRAVÉS DE LA DETECCIÓN DEL GEN *mcy*.**

ESTUDIANTE:

Clara María Arboleda Baena

ASESOR:

Jaime Alberto Palacio Baena.

Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental -GAIA

Maestría en Ciencia Ambientales

Universidad de Antioquia

2016

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se lo dedico a mi familia.

Agradezco a mi mamá y mi papá su amor y dedicación. Ellos son las personas que más quiero hacer sentir orgullosas en este mundo. Les agradezco infinitamente sus enseñanzas y acompañamiento durante mi vida.

Le agradezco a mi hermano Felipe por ser el mejor hermano que alguien podría tener. Le agradezco su apoyo y amistad incondicional. Gracias por creer en mis sueños.

Le agradezco a la profe Judith y al profe Jaime su cariño, apoyo y guía durante gran parte de mi educación profesional y personal. Les agradezco por hacerme sentir parte de otra familia.

Le agradezco a la profe María Teresa todo el apoyo, consejos y acompañamiento durante el proyecto. Gracias por su cariño.

Le agradezco a Lini por su amistad. Gracias por tolerar mi estrés, estar pendiente durante los malos momentos y ser un gran apoyo.

Le agradezco a Hilda y Marisol toda la ayuda que recibí. Gracias por hacer esto posible.

Le agradezco al profesor Muskus y la profesora Elisabeth Pohlen su apoyo y asesoría, aprendí mucho con su ayuda.

Le agradezco a Luz Yaneth su ayuda durante la construcción del trabajo y la revisión del manuscrito. Gracias por creer en mí.

Mis mayores agradecimientos para el grupo GAIA, para los amigos y compañeros que están y los que ya partieron. Gracias por 7 años de aprendizajes y momentos gratos.

Agradezco a EPM y Colciencias por el financiamiento del proyecto y mis estudios.

Agradezco a la Corporación Académica Ambiental y a la Maestría en Ciencias Ambientales todo el aprendizaje que me brindaron sobre la problemática ambiental y la responsabilidad que tenemos como investigadores. Espero devolver este conocimiento con aportes a la sociedad que permitan hacer de éste planeta un mejor lugar para vivir.

Le agradezco a mi alma mater, la Universidad de Antioquia, por formarme como persona y profesional. A los profesores Juan Pablo Niño, Jhon Jairo Ramírez y Jose Albeiro Acevedo por estar durante mi formación profesional y creer en mí. Les agradezco su apoyo y confianza.

Finalmente, le agradezco a Juan David su apoyo, amor y amistad. Gracias por creer en mí y ser mi compañía durante el camino que emprendí para alcanzar mis sueños.

“Para que pueda surgir lo posible es preciso intentar una y otra vez lo imposible”. Hermann Hesse

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	6
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	8
3. MARCO TEÓRICO	9
4. ANTECEDENTES	15
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
6. HIPÓTESIS	16
7. OBJETIVOS	16
7.1 Objetivo general	16
7.2 Objetivos específicos	16
8. MÉTODOS	17
8.1 Área de estudio y estaciones de muestreo.	17
8.2 Metodología de campo	18
8.3 Toma y tratamiento de muestras de agua	20
8.4 Determinación del potencial tóxico de cianobacterias.	20
8.5 Abundancia de cianobacterias nostocales y chroococcales	22
8.6 Análisis estadístico	23
9. RESULTADOS	24
9.1 Precipitación y nivel del embalse	24
9.2 Variables Físicoquímicas y clorofila a	25
9.3 Abundancia de cianobacterias Nostocales y Chroococcales.	26
9.4 Potencial Tóxico	34
9.5 Análisis Estadísticos	43
10. DISCUSIÓN	45
10. CONCLUSIONES	51
12. BIBLIOGRAFÍA	52
13. ANEXOS	62

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Localización de las estaciones de muestreo	18
Tabla 2. Fechas muestreos	19
Tabla 3. Métodos usados para el análisis de variables fisicoquímicas en agua.	20
Tabla 4. Primers para la detección del gen <i>mcy</i> en <i>Microcystis sp</i> y en <i>Dolichospermum sp</i>	23
Tabla 5. Volumen (m ³) y nivel de llenado (%) de almacenamiento durante los muestreos en el embalse Riogrande II (EPM, 2015).	24
Tabla 6. Profundidad con mayor concentración de clorofila a del grupo espectral azul en (µg/l) por muestreo y estación en el embalse Riogrande II.	25
Tabla 7. Variables fisicoquímicas en la profundidad de mayor concentración de clorofila a (µg/l) en el embalse Riogrande II.....	26
Tabla 8. Abundancia de nostocales y chroococcales en tres estaciones en el embalse Riogrande II.	27
Tabla 9 Análisis de Especificidad y Efectividad para los primers del orden Nostocales (<i>Anabaena</i>)	35
Tabla 10 Análisis de Especificidad y Efectividad para primers de la literatura.....	36
Tabla 11 Estandarización de la Tm (°C) para los primers 3, 4, 5, 6 y 7.	39
Tabla 12 Temperaturas de Fusión (°C) que permitieron una amplificación adecuada de los primers 3, 4, 5, 6 y 7.....	39
Tabla 13 Amplificación de los primers 3 y 4 en las muestras de agua del embalse	42
Tabla 14 Oligos diseñados para corroborar el buen funcionamiento de los primers 5, 6 y 7 que amplifican el gen <i>mcy</i> de cianobacterias Nostocales	43
Tabla 15 Correlación de Spearman de los datos fisicoquímicos obtenidos durante los muestros de diciembre 2014 a mayo 2015	44

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Morfología característica del Orden Nostocales (Palacio et al., 2015).....	9
Figura 2. Morfologías característica del Orden Chroococcales (Palacio et al., 2015).....	10
Figura 3. Modelo propuesto por Kaebernick & Neilan (2001) para la biosíntesis de Microcistina-LR.....	11
Figura 4. Ubicación del embalse Riogrande II en el departamento de Antioquia (Colombia) (Vahos et al., 2011).	17
Figura 5. Ubicación de las estaciones de muestreo (Elaborado por Sara Correa).....	18
Figura 6. Perfilador CTD (A) y fluorómetro Fluoro Probe bbe (B) para el levantamiento de información de campo.....	19
Figura 7. Variación multianual en el almacenamiento del embalse Riogrande II 1992 – 2015.....	24
Figura 8. Densidad de cianobacterias en tres estaciones en el embalse Riogrande II.	28
Figura 9. Biovolumen de cianobacterias en tres estaciones en el embalse Riogrande II.....	28
Figura 10. Contribución de las clorofitas (■), cianofitas (■), diatomeas (■) y cryptofitas (■) a la clorofila a total (● en la estación 1.	29
Figura 11. Contribución de las clorofitas (■), cianofitas (■), diatomeas (■) y cryptofitas (■) a la clorofila a total (● en la estación 2.	30
Figura 12. Contribución de las clorofitas (■), cianofitas (■), diatomeas (■) y cryptofitas (■) a la clorofila a total (● en la estación 3.	31
Figura 13. Clorofila a del grupo espectral azul en la estación 1 en diciembre de 2014 (■), marzo (■), abril (■) y mayo (■) de 2015.	32
Figura 14. Clorofila a del grupo espectral azul en la estación 2 en diciembre de 2014 (■), marzo (■), abril (■) y mayo (■) de 2015.	33
Figura 15. Clorofila a del grupo espectral azul en la estación 3 en diciembre de 2014 (■), marzo (■), abril (■) y mayo (■) de 2015.	33
Figura 16. Alienación de las secuencias del gen <i>mcyE</i> para <i>Microcystis</i> (Fuente: Jalview, ClustalOmega).....	34
Figura 17. Alienación de las secuencias del gen <i>mcyE</i> para <i>Anabaena</i> (Fuente: Jalview, ClustalOmega).....	34
Figura 18. Bandas de ADN en muestras procedentes de las estaciones. A.) Estación 1 (E1) y Estación 2 (E2) durante cuatro muestreos (1, 2, 3 y 4). B.) Estación 3 (E3), Controles (1C, 2C, 3C, 4C) durante cuatro muestreos (1, 2, 3 y 4) y control positivo para la presencia de cianobacterias (Porce(+)).	38
Figura 19. Amplificación de (A) Primer 3: Control Negativo (C(-)), Bacterias heterótrofas (<i>P.aeruginosa</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>E.coli</i>), Estación 3 del embalse durante el tercer muestreo (3E1) y Control Positivo (P(+)). (B) Primer 4: Controles Negativo (C(-)), Bacterias heterótrofas (<i>P.aeruginosa</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>E.coli</i>), Estación 1 del embalse durante el cuarto muestreo (4E1) y Control Positivo (P(+))......	40
Figura 20. Prueba de Inhibición. (A) Amplificación del primers 3 (P3) en controles positivos (+), muestras de Riogrande II (1E2, 2E3 y 3E1), mezcla entre muestras del embalse y el control positivo (M1, M2, M3) y controles negativos (-). (B) Amplificación del primers 4 (P4) en controles positivos (+), muestras de Riogrande II (1E2, 2E3 y 3E1) y mezcla entre muestras del embalse y el control positivo (M1, M2, M3) Y controles negativos (-).	41
Figura 21. Amplificación del primer 3 en las muestras del embalse Riogrande II. Estación 1 (E1), Estación 2 (E2) y Estación 3 (E3) durante cuatro muestreos (1, 2, 3 y 4). Control positivo (Control +) y Control Negativo (Control -).....	41
Figura 22. Amplificación del primer 4 en las muestras del embalse Riogrande II. Estación 1 (E1), Estación 2 (E2) y Estación 3 (E3) durante cuatro muestreos (1, 2, 3 y 4). Control positivo (Control +) y Control Negativo (Control -).....	42
Figura 23. Nivel del embalse (■), densidad (■) y biovolumen (■) de Nostocales en tres estaciones en el embalse Riogrande II entre diciembre de 2014 y mayo de 2015.	47
Figura 24. Nivel del embalse (■), densidad (■) y biovolumen (■) de Chroococcales en tres estaciones en el embalse Riogrande II entre diciembre de 2014 y mayo de 2015.	47
Figura 25. Nivel del embalse (■), densidad (■) y biovolumen (■) de cianobacterias Nostocales y Chroococcales en tres estaciones del embalse Riogrande entre diciembre de 2014 y mayo de 2015.	48
Figura 26. Nivel del embalse y concentración de hierro en Riogrande II.	50

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1 Ensayo de verificación del control negativo. A. Amplificación del Primer 3 en la Estación 1, 2, 3 y Control en la primera campaña, control positivo: Porce (+) y control Negativo: Control (-) B. Amplificación del Primer 4 en la Estación 1, 2, 3 y Control en la primera campaña, control positivo: Porce (+) y control Negativo: Control (-)	62
Anexo 2 Verificación del CIMg ₂ y BSA con el primer 3. A. (1)	62
Anexo 3 Correlación de Spearman	63
Anexo 4 Datos Fluorómetro	64

1. INTRODUCCIÓN

La ubicación geográfica en la zona ecuatorial, la presencia de áreas localizadas en un amplio espectro de niveles altitudinales y el régimen de lluvias han hecho que Colombia posea una de las mayores ofertas hídricas del planeta. Sin embargo, esta oferta no está distribuida homogéneamente en el territorio (Foro Consultivo Científico y Tecnológico, 2012) y ha sido afectada negativamente como resultado del deterioro de la calidad del recurso.

El aumento de la población y el modelo económico actual favorecen el crecimiento de los centros urbanos y en consecuencia, el incremento de la demanda del recurso hídrico para consumo humano y para otros usos como la generación de energía eléctrica. Como respuesta a esta situación se ha aumentado la construcción de embalses en las últimas décadas (Jenkins, 1976; Castro-Salazar & Cordero-Pinchansky, 2002; Echenique *et al.*, 2014). La transformación de ambientes lóticos a lénticos y de terrestres a acuáticos puede conducir a modificaciones importantes en las condiciones ambientales de las áreas afectadas por estos proyectos (Roldán & Ramírez, 2008).

El crecimiento masivo de fitoplancton y especialmente de cianobacterias, se ha convertido gradualmente en uno de los principales problemas ambientales en sistemas de almacenamiento de agua. Numerosos autores han encontrado una relación directa entre la eutrofización, el cambio climático y la densidad de cianobacterias (Cavalcante *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2009; Ferrari *et al.*, 2011; Sinha *et al.*, 2012; Reichwaldt & Ghadouani, 2012). A nivel ecosistémico el crecimiento masivo de cianobacterias se ha asociado a factores como el clima lumínico, la temperatura, la estabilidad térmica de la columna de agua, el pH, la disponibilidad de nutrientes y la herbivoría (Codd *et al.*, 2005; Aubriot *et al.*, 2009). No obstante, la dinámica de los florecimientos y las asociaciones de las especies son frecuentemente difíciles de predecir y están relacionadas con las condiciones ambientales locales (Palacio *et al.*, 2015).

Las cianobacterias son microorganismos Gram negativos, presentan una amplia distribución geográfica y ecológica y pueden proliferar exitosamente en condiciones extremas. Como parte de su metabolismo secundario las cianobacterias producen sustancias que pueden actuar como fotoprotectores, factores alelopáticos o como defensa contra los depredadores (Van Wagoner *et al.*, 2007). No obstante, estos metabolitos son también potentes neurotoxinas y hepatotoxinas para animales y humanos.

De acuerdo con Humpage (2008), aproximadamente la mitad de los florecimientos de cianobacterias son potencialmente tóxicos. Aunque el problema asociado a las cianotoxinas se identificó hace más de 130 años (Francis, 1878), las estrategias de gestión todavía no logran predecir con fiabilidad la toxicidad de las floraciones debido a la compleja interacción de factores físicos y químicos que no sólo afectan la producción de toxinas dentro de las células, sino también la sucesión de especies y de cepas tóxicas y no tóxicas (Reichwaldt & Ghadouani, 2012).

A pesar de que Dörr *et al.*, (2010) señalan que no existen antecedentes sobre la presencia de microcistinas en Colombia, Bula (1985) describió un florecimiento de *Anacystis cyanea* (c.f. *Microcystis aeruginosa*) en la Ciénaga Grande de Santa Marta, Escobar y Manjarres (1985) registraron en la Ciénaga San Rafael de Buenavista un florecimiento de *Microcystis aeruginosa* y de *Nostoc commune*. Nuevamente, en la Ciénaga Grande de Santa Marta se registró la muerte de más de 20 toneladas de peces asociada posiblemente a un florecimiento de cianobacterias (Mancera y Vidal, 1994). En 10 humedales del altiplano cundiboyacense Vásquez *et al.*, (2006) encontraron dominancia de *Microcystis spp.* asociada a condiciones de eutrofia. En el antiguo delta del Río Sinú, Galeano & Villalobos (2010) reportaron gran abundancia de c.f. *Planktolyngbya limnetica*. Así mismo, en el Río Cesar, Rivera y Gómez (2010) observaron dominancia de *Phormidium sp.*, *Oscillatoria sp.* y *Pseudanabaena sp.* Se han registrado eventos no publicados de crecimiento masivo de estos microorganismos en la fase temprana de embalses dominados por *Microcystis* y *Cylindrospermopsis* (Codd *et al.*, 2005).

El embalse Riogrande II abastece una de las plantas de tratamiento de agua potable del Valle de Aburra. La cuenca del embalse presenta un alto nivel de intervención antrópica y sus aguas son receptoras de cargas importantes de residuos de origen doméstico y agropecuario. El ingreso de fósforo (P) y de nitrógeno (N) a través de los principales tributarios del embalse (ríos Grande y Chico) ha contribuido significativamente al incremento del estado trófico del sistema y al crecimiento masivo del fitoplancton (Correa, 2008; Palacio *et al.*, 2015). Durante el florecimiento de cianobacterias entre el 2006- 2007, Correa (2008) evidenció la presencia de microcistinas mediante pruebas de ELISA y ensayos de toxicidad del agua y del extracto de cianobacterias con *Daphnia pulex* y ratones como modelos de estudio. De acuerdo con Palacio *et al.*, (2015), en el embalse se identificaron 11 taxa de los órdenes Chroococcales, Oscillatoriales y Nostocales. Los géneros con mayor número de taxa fueron *Microcystis* y *Dolichospermum*, responsables de formar floraciones, potencialmente tóxicas. Además, para los ocho géneros identificados en este embalse existen reportes de producción de cianotoxinas.

Es evidente la necesidad de determinar el riesgo asociado a la presencia de florecimientos de cianobacterias en el embalse. Para ello, se debe generar conocimiento mediante técnicas moleculares, que permitan diferenciar cepas con capacidad para producir toxinas mediante la evaluación del operón *mcy* o el cluster del gen de microcistina *scintisa*, que codifican para el complejo de las enzimas responsables de la biosíntesis de la microcistina. En el presente trabajo, se estableció la distribución de las cianobacterias de los Órdenes Nostocales y Chroococcales en el embalse Riogrande II y se identificaron cianobacterias potencialmente tóxicas. Asimismo, se cuantificó la expresión de microcistinas en cepas tóxicas a través de la aplicación de la metodología PCR en tiempo real, técnica que permite cuantificar el ARNm de la microcistina en muestras con diferentes cianobacterias (Sipari *et al.*, 2010)

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El embalse Riogrande II, ubicado en la parte central del departamento de Antioquia, es empleado como reservorio de agua para potabilización y generación de energía. Su cuenca se caracteriza por el uso indiscriminado de agroquímicos, alta deforestación para la expansión de la frontera agrícola, ganadería intensiva para la producción de leche, industria porcina, cultivos de tomate y papa, descarga de aguas residuales de los centros urbanos y disposición inadecuada de desechos sólidos (Correa, 2008; Palacio *et al.*, 2015). Sus principales tributarios (ríos Grande y Chico) son receptores de aguas ricas en nutrientes, materia orgánica y plaguicidas y como resultado se ha presentado un proceso de eutrofización del sistema, que favorece el crecimiento de la biomasa de cianobacterias tóxicas y desde el año 2006 se han observado florecimientos de estos microorganismos en el embalse. En ensayos con *Daphnia pulex* y cepas de ratones C57BL/6, Correa (2008) encontró una alta toxicidad de las aguas y extractos de cianobacterias procedentes de Riogrande II. Herrera-Loaiza *et al.*, (2015) detectaron concentraciones significativas de microcistinas LR. Palacio (2014) y Palacio *et al.*, (2015) identificaron 11 especies en la zona fótica del embalse, cuatro del orden Nostocales y siete Chroococcales. Entre estas son potenciales productores de toxinas importantes *Dolichospermum sp* y *Microcystis sp*.

En los embalses de Colombia no se conocen los factores ambientales y mecanismos moleculares que pueden estar mediando la expresión de genes tóxicos en cianobacterias. En consecuencia, es importante avanzar en el conocimiento de las condiciones que podrían estar favoreciendo dicha expresión en el embalse. En reservorios de agua para la potabilización como Riogrande II, la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas constituye un riesgo para la salud de los usuarios del recurso (Hudnell, 2008).

3. MARCO TEÓRICO

Las cianobacterias, procariotas del dominio *Bacteria*, son microorganismos fotosintéticos oxigénicos y del tipo Gram negativo (Mandigan *et al.*, 2004). Su origen se remonta a unos 3500 millones de años (Roset *et al.*, 2001) y son responsables de la formación de la atmósfera oxigénica. Las cianobacterias poseen una gran adaptabilidad a condiciones ambientales y en consecuencia, pueden ocupar hábitats muy diversos y extremos. En los ecosistemas limnéticos crecen preferentemente en rangos de pH entre 6 y 9 y temperaturas entre 15 y 30°C, proliferan a elevadasaltas concentraciones de nitrógeno y fósforo (Mez *et al.*, 1997; Ramírez *et al.*, 2005). Altas densidades de cianobacterias son responsables de características organolépticas desagradables en el agua (Codd *et al.*, 1999) y adicionalmente, la colmatación de los filtros de las plantas potabilizadoras se le atribuye en gran parte a estos microorganismos (Pizzolon, 1996). Algunas especies pueden producir toxinas, que incluso en concentraciones muy bajas pueden afectar procesos fisiológicos (Codd *et al.*, 1999).

En su última revisión con enfoque polifásico, Komárek *et al.*, (2014) describieron ocho (8) órdenes: Chroococcales, Nostocales, Gloeobacterales, Synechococcales, Spirulinales, Pleurocapsales, Oscillatoriales y Chroococcidiopsidales: Los dos primeros ordenes son los principales productores de toxinas.

El Orden Nostocales agrupa cianobacterias filamentosas, heterocitadas, uniseriadas o multiseriadas. Poseen tricomas isopolares o heteropolares, sin o con ramificaciones falsas o verdaderas. Las Nostocales presentan una división celular en un plano, siempre perpendicular al eje del tricoma y se reproducen mediante hormogonios o hormocitos. Los tilacoides son algo helicoidales, se distribuyen irregularmente, en grupos en la periferia o en todo el volumen de la célula vegetativa (Bonilla, 2009). Según Kruk (2010), el orden Nostocales pertenece al grupo funcional III, principalmente estrategias K, de gran tamaño y que crecen lentamente. Su alta relación superficie/volumen les confiere una mayor tolerancia a condiciones limitantes de luz, bajas tasas de hundimiento y un mejor acceso a los recursos. La capacidad de fijar nitrógeno (Heterocito) y de formar estructuras de resistencia (acinetos), les confiere a algunas cianobacterias una ventaja en ambientes con niveles bajos de nutrientes (*ver* Figura 1).

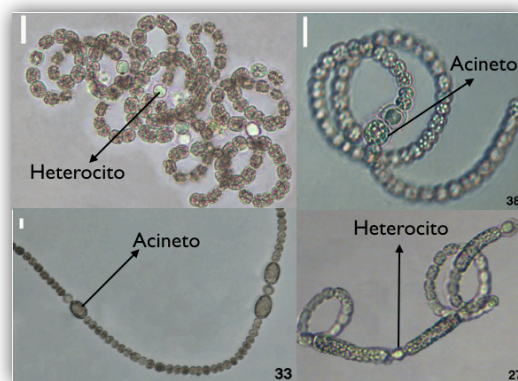


Figura 1. Morfología característica del Orden Nostocales (Palacio et al., 2015).

El Orden Chroococcales incluye cianobacterias que pueden tener talo unicelular o colonial, las colonias y algunos individuos unicelulares presentan una envoltura mucilaginosa (ver Figura 2). Estos microorganismos se reproducen por fisión binaria o múltiple, poseen división celular de uno a varios planos y tienen tilacoides dispuestos de diversas formas, dependiendo del grupo (parietal, periférica, radial, dispersos en toda la célula; Bonilla, 2009). Kruk (2010) clasificó al orden Chroococcales en el grupo funcional VII, estrategia K, colonias grandes con estructuras de flotabilidad como mucílago, lípidos y aerótopos. Tienen la capacidad de permanecer en latencia en el sedimento (Paerl, 1988; De Tezanos Pinto & Litchman, 2010; Sant'anna *et al.*, 2006). El gran tamaño y volumen y la baja relación superficie/volumen hacen que las especies de éste grupo sean sensibles a la disponibilidad de recursos y algunos géneros son potenciales productores de toxinas.

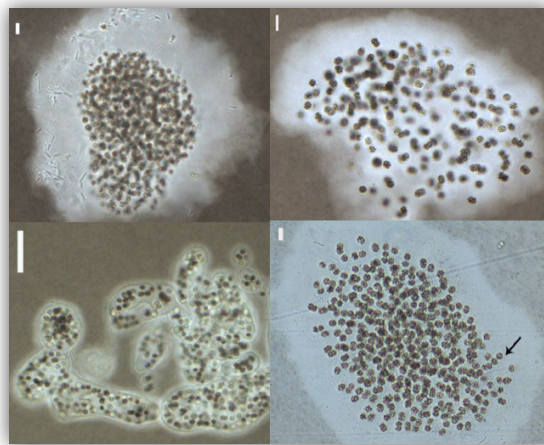


Figura 2. Morfologías característica del Orden Chroococcales (Palacio *et al.*, 2015).

A nivel mundial las evidencias del aumento de florecimientos nocivos de cianobacterias se han incrementado considerablemente (O'Neil *et al.*, 2012). Los florecimientos afectan la sostenibilidad de los ecosistemas acuáticos e implican riesgos potenciales para la salud humana a causa de las cianotoxinas (Hudnell, 2008). Existen numerosos antecedentes de toxicidad en seres humanos, el primer reporte fue publicado por Francis (1878) en lagos australianos y el incidente más conocido se registró en un centro de diálisis en Caruaru, Brasil, donde murieron más de 70 personas (Azevedo *et al.*, 2002).

De acuerdo con Kaebnick & Neilan (2001), las cianotoxinas se clasifican en tres grandes grupos: ciclopéptidos (Microcistinas y Nodularinas), alcaloides (Anatoxinas, Anatoxinas-A, Aplysiatoxinas, Cylindrospermopsinas, Lyngbyantoxinas-a y Saxitoxinas) y lipopolisacáridos (sustancias irritantes). Mientras las Chroococcales se caracteriza por producir microcistinas, las Nostocales pueden producir tanto microcistinas como nodularinas, anatoxinas-A, anatoxina-A (S), cylindrospermopsinas y saxitoxinas.

Para diferenciar cepas de cianobacterias tóxicas de no tóxicas se emplean técnicas moleculares, que permiten detectar el operón *mcy* o el cluster del gen de la microcistina sintetasa, que codifican para el complejo de enzimas responsables de la biosíntesis de la microcistina. En la *Figura 3* se muestra el cluster de genes *mcy* A-J y la construcción de la cianotoxinas por los módulos péptido y policétido sintetasa. El número en los círculos indica el orden de los aminoácidos incorporados a la cadena de péptidos (genes *mcy* A, B, C, EP, GP) y de los rectángulos el orden del policétido sintetasa en la formación del extremo Adda (*mcy* GK, EK, D). Este cluster de 55 kb incluye los genes péptido sintetasa no ribosomal, policétido sSintetasa, gen mixto péptido sintetasa no ribosomal y policétido sintetasa y enzimas sastre (Rantala, *et al.*, 2004). Al realizar un análisis filogenético con las secuencias de biosíntesis de los genes *mcyA*, *mcyD*, *mcyE* y las secuencias housekeeping 16S rRNA y *rpoC1*, Rantala (2007) obtuvo árboles que indican que los genes *mcy* han coevolucionado con genes housekeeping durante la evolución de la microcistina. Además, encontró que la biosíntesis de la microcistina es una vía metabólica secundaria muy antigua presente desde el último ancestro común de las cianobacterias, lo que indica, contrario a lo que se pensaba, que a través del tiempo algunos linajes han perdido estos genes.

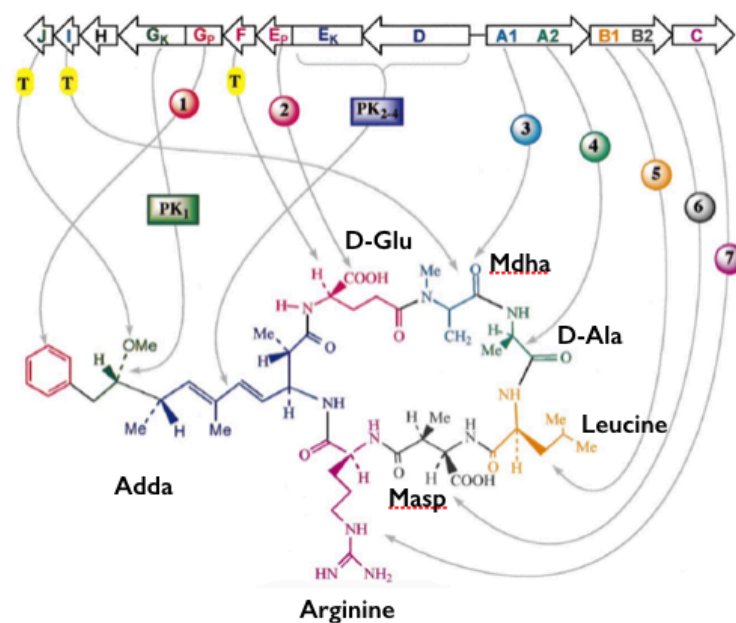


Figura 3. Modelo propuesto por Kaebnick & Neilan (2001) para la biosíntesis de Microcistina-LR.

La sensibilidad de las técnicas moleculares permite estudiar un grupo complejo como las cianobacterias que poseen genomas que varían entre 1.4 y 9.1 Mbp en tamaño, para los cuales el contenido C/G oscila entre un 31% a un 63%, el número de genes que codifican para proteínas varía de 1214 hasta 8446 y la proporción de nucleótidos codificantes entre un 52 a un 94% (Larsson *et al.*, 2011). Las metodologías moleculares más utilizadas para evaluar el potencial tóxico de la microcistinas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), FISH, ELISA, PCR en tiempo real (qPCR), Citometría de Flujo y Microarreglos ((Dziallas *et al.*, 2011, Gan *et al.*, 2009, Metcalf *et al.*, 2009, Rantala,

2007, Sipari *et al.*, 2010, Straub *et al.*, 2011). Estas metodologías permiten estudiar los genes de la microcistina sintetasa que se encuentran en el operón *mcy* y son los responsables de la expresión de la microcistina.

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una técnica desarrollada por Mullis (1983), económica y muy eficiente para determinar la presencia de genes en una muestra. Esta técnica permite copiar y sintetizar grandes cantidades de segmentos de ADN diana específicos. Rantala (2007) evaluó cultivos de cianobacterias axénicos y muestras de lagos en diferentes estados tróficos, mediante el empleo de la PCR y primers contruidos a partir de las regiones conservadas de los genes *mcyD* (*mcyD*-F/R) and *mcyE* (*mcyE*-F2/R4). Metcalf *et al.*, (2009) emplearon también PCR para detectar el gen *mcy* y verificar el potencial tóxico de las muestras de cianobacterias procedentes de cultivos axénicos y de muestras ambientales.

El **FISH** o Hibridación *in situ* fluorescente, utiliza sondas que emiten fluorescencia cuando se unen a segmentos diana del cromosoma o el mRNA con un alto grado de complementariedad, es una técnica costosa, pero con una buena resolución. Ésta técnica ha permitido la detección simultánea de múltiples genes y el análisis cuantitativo de células diana e imágenes de células vivas (Levsky & Singer, 2003), es muy utilizada para la identificación, cuantificación y caracterización filogenética de poblaciones microbianas en ambientes complejos (Amann *et al.*, 2008). Metcalf *et al.* (2009) utilizaron esta técnica para detectar los genes de Microcistina y el potencial tóxico de las muestras. Dziallas *et al.* (2011) modificaron esta técnica en la llamada **RING-FISH** para determinar el potencial tóxico y cuantificar la expresión de los genes de la microcistina. GAN *et al.*, (2009) analizaron la presencia de microcistina con FISH en cultivos de cianobacterias.

ELISA, Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas, es una herramienta molecular rápida para la detección de microcistinas en muestras de agua. La más usada es la ELISA anti-MC-LR, que reconoce microcistinas con ayuda de anticuerpos policlonales que tienen alta reactividad con las variantes MC-LR, MC-RR y MC-YR y baja con la microcistina-L y microcistina-LA (Moreno *et al.*, 2011). Esta técnica detecta la toxina, pero no el potencial tóxico de las cianobacterias, ya que muchas cianobacterias pueden tener el gen *mcy* y no expresarlo (Roset *et al.*, 2001). Además, en una misma población existen cepas productoras y no productoras de toxinas (Roset *et al.*, 2001), por tanto, se obtendría un falso negativo. GAN *et al.* (2009) utilizaron esta herramienta para discriminar entre cepas tóxicas y no tóxicas, pero la técnica más apropiada para verificar el potencial tóxico es la PCR convencional para amplificar el gen *mcy* (Metcalf *et al.*, 2009) y Rantala, (2007).

La qPCR, PCR en tiempo real permite cuantificar fragmentos de ácidos nucleicos a una alta velocidad, sensibilidad y especificidad (Qiu *et al.*, 2013). Ésta técnica tiene un alto potencial para cuantificar la expresión ARNm de cianotoxinas en muestras donde coexisten diferentes cianobacterias y permite analizar el número de copias del gen *mcy* que se está expresando (Sipari *et al.*, 2010). Sipari *et al.* (2010) analizaron la transcripción de toxinas de cepas potencialmente tóxicas de cultivos axénicos y muestras de un lago y cuantificaron el número de copias del gen *mcyE*

en *Anabaena sp* y en *Microcystis sp*. Rantala (2007) evaluó cultivos de cianobacterias axénicos y muestras naturales mediante primers de las regiones conservadas de los genes *mcyD* (*mcyD-F/R*) y *mcyE* (*mcyE-F2/R4*).

La Citometría de Flujo (FCM) permite la discriminación y cuantificación rápida de células diana del fitoplancton en muestras complejas, basada en la emisión de auto-fluorescencia de los pigmentos intracelulares tales como clorofila y ficobilina. (Zhou *et al.*, 2012). Gan *et al.* (2009), realizaron una FCM después de hibridar una sonda que emitía fluorescencia en presencia del gen *mcy* y obtuvieron un buen recuento y recuperación de *Microcystis sp* tóxicas en relación con las no tóxicas. Esta herramienta es novedosa para la detección de cepas con el gen tóxico, pero es costosa como análisis de rutina en laboratorios que aún no la han estandarizado.

La técnica de Microarreglos permite una visión general de la expresión de células en un tiempo dado (Straub *et al.*, 2011) Se ha usado para observar cambios en la transcripción de genes o para detectar e identificar tipos de cianobacterias blanco (Rantala, 2007). Straub *et al.* (2011), estudiaron la dinámica de la expresión génica en *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 durante un ciclo de luz y oscuridad con la metodología de Microarreglos. En este trabajo, la biosíntesis (incremento de transcripción) de metabolitos secundarios, como microcistinas, auroginosinas y cyanopeptolinas, se presentan esencialmente durante el periodo de luz, sugiriendo que hacen parte del metabolismo central diurno. Los microarreglos, al igual que la qPCR, permiten cuantificar la transcripción mientras que la PCR convencional permite hallar el potencial tóxico de las muestras. A través de todas estas técnicas es posible correlacionar la distribución de cianobacterias y la producción de cianotoxinas en respuesta a variables ambientales en un ecosistema acuático y entender los factores que regulan esta expresión.

La función de las microcistinas en el metabolismo de las cianobacterias ha sido ampliamente estudiada. Se ha encontrado que bajas concentraciones de hierro se correlacionan con el aumento de la producción de cianotoxinas (Nellan *et al.*, 2013). Altas intensidades lumínicas aumentan el consumo celular de hierro y esto se ha relacionado con una mayor producción de toxinas. Otros estudios indican que a menor concentración de hierro, que implica crecimiento celular lento, se presenta mayor cantidad de microcistina (Utkilen & Gjolme, 1995; Lukac & Aegerter, 1993). Un aumento pequeño del fósforo puede afectar el crecimiento de las cianobacterias y la producción de toxinas (Kaebernick & Neilan, 2001). Se ha encontrado un decrecimiento en la producción de microcistina en *Anabaena*, *Microcystis* y *Oscillatoria*, anatoxina-a en *Aphanizomenon* y nodularina en *Nodularia* a bajas concentraciones de fósforo (Sivonen & Jones, 1999; Nellan *et al.*, 2013). En ambientes pobres en nitrógeno los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia* y *Cylindrospermopsis* presentan altos niveles de microcistinas, anatoxina-a y nodularina (Rapala *et al.*, 1993; Rapala *et al.*, 1997; Lehtimaeki *et al.*, 1997; Saker *et al.*, 1999). En contraste, cepas de *Oscillatoria* y *Microcystis*, no fijadoras de nitrógeno, presentan altos niveles de cianotoxinas en presencia de altas concentraciones de nitrógeno (Sivonen & Jones, 1999).

Las concentraciones de Microcistina y Nodularina, en estudios con *Anabaena*, *Microcystis* y *Nodularia*, fueron mayores entre 18 y 25°C (Sivonen & Jones, 1999). Las mayores concentraciones de toxinas se han reportado, cuando el crecimiento celular es óptimo. Esto refleja una relación directa entre la tasa de producción de toxinas y el crecimiento celular (Oh *et al.*, 2000; Orr & Jones, 1998). Straub *et al.* (2011), al estudiar la dinámica de la expresión génica en *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 durante un ciclo de luz y oscuridad con la metodología de Microarreglos, encontraron que la biosíntesis (incremento de transcripción) de metabolitos secundarios, como microcistinas, auroginosinas y cianopeptolinas, se presentan esencialmente durante el periodo de luz, sugiriendo que hacen parte del metabolismo central diurno. En una revisión sobre el tema, Kaebernick & Neilan (2001) concluyeron que microcistina posee una alta afinidad con el hierro y propiedades sideróforas. Adicionalmente, el extremo Adda (C20 amino acid; 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadienoic acid) de la toxina se puede unir a los tilacoides y atraer los metales desde el citoplasma (*Figura 3*). Kaebernick & Neilan (2001) afirman que un aumento de la transcripción de los genes implicados en la producción de la toxina, principalmente en el gen *mcy*, se presenta a niveles altos de intensidad lumínica y bajas concentraciones de hierro. Toda esta información apunta a que los florecimientos (blooms) de cianobacterias potencialmente tóxicas son eventos complejos que no son causados por una variable ambiental sino por la participación de múltiples factores que ocurren simultáneamente (O'Neil *et al.*, 2012).

4. ANTECEDENTES

En general los embalses en Colombia están destinados a la generación de energía hidroeléctrica y/o al almacenamiento de agua para la potabilización. Las áreas de los embalses varían entre 0.2 y 74 km² y su ubicación entre los 70 y 3000 m.s.n.m. (Roldán & Ramírez, 2008). En el embalse Riogrande II predominó *Radiocystis sp.* sobre *M. wesenbergii* y se encontró toxicidad de extractos mediante ensayos con *Daphnia pulex*, ratones y la técnica ELISA (Correa, 2008). Estas dos cianobacterias, junto con *M. aeruginosa*, *M. protocystis* y *Anabaena sp.*, detectadas también en el embalse son productoras potenciales de microcistinas. Rodríguez (2011) identificó representantes de los órdenes Chroococcales, Oscillatoriales y Nostocales en este embalse. Adicionalmente, logró aislar y cultivar cianobacterias picoplanctónicas como *Cyanobium sp.*, *Synechocystis sp.*, *Aphanocapsa sp.* y *Pseudanabaena mucicola*, algunas potenciales productoras de toxinas. Palacio (2014) y Palacio *et al.*, (2015) identificaron 11 taxa de cianobacterias en el embalse pertenecientes a cinco familias del orden Chroococcales (Merismopediaceae, Microcystaceae, Synechococcaceae), de la familia Pseudanabaenaceae del orden Oscillatoriales de la familia Nostocaceae del orden Nostocales. Los géneros con mayor número de especies fueron *Microcystis* y *Dolichospermum*, conocidos por ser responsables de floraciones con potencial tóxico.

Por medio de PCR y Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE) y a partir de la amplificación de secuencias de los genes *mcyA* y *mcyE* en muestras de agua procedentes del embalse Riogrande II, Hurtado-Alarcón y Polanía-Vorenberg (2014) encontraron toxicidad para *Microcystis sp.* Herrera *et al.*, (2015) reportaron la presencia de microcistina-LR en muestras de agua del embalse Riogrande II por medio de la cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). Obteniendo una concentración máxima de toxina de 538 µg/g.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Presentan las cianobacterias Nostocales y Chroococcales del embalse Riogrande II el gen de toxicidad?

6. HIPÓTESIS

Dado que en el embalse Riogrande II se presentan condiciones ambientales favorables para el crecimiento de cianobacterias, entonces se espera que en este embalse se encuentren cepas portadoras del gen *mcy*

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Determinar el potencial tóxico de las cianobacterias en el embalse Riogrande II mediante la detección del gen *mcy*

7.2 Objetivos específicos

- Establecer la biomasa de cianobacterias Nostocales y Chroococcales en tres estaciones del embalse Riogrande II durante cuatro muestreos.
- Estandarizar la metodología PCR para la detección del gen *mcy* en muestras de agua del embalse Riogrande II.
- Determinar diferencias espaciales y temporales en la presencia de cepas portadoras del gen *mcy* y su relación con las condiciones ambientales.

8. MÉTODOS

8.1 Área de estudio y estaciones de muestreo.

El embalse Río Grande II se construyó entre 1986 y 1988, se ubica a 2270 msnm en la parte central del departamento de Antioquia, Colombia y en la subcuenca del Río Grande entre los 6° 28' y 6° 33' Norte y los 75° 27' y 75° 33' Oeste (*Figura 4*). El embalse presenta un área superficial de 1200 ha, un volumen de 220 hm³, una profundidad promedio de 37.9 m y una longitud máxima de 10 km. El embalse regula las aguas de los ríos Chico y Grande y tiene una cuenca de drenaje de 1.041 km². En el área del embalse se presentan un régimen climático bimodal con dos periodos de lluvias de abril a junio y de septiembre a noviembre, el resto del año es seco (EPM, 2006). La precipitación anual en la cuenca oscila entre 1.800 y 3.000 mm (EPM, 2005).

En las cuencas de los tributarios se usan indiscriminadamente agroquímicos, en áreas destinadas a la ganadería de leche, industria porcina, cultivos de tomate y papa, descarga de aguas residuales de los centros urbanos y disposición inadecuada de desechos sólidos (Correa, 2008; Palacio *et al.*, 2015). La pesca de la especie *Brycon henni* o sabaleta se ha convertido en otro uso importante para el embalse. Riogrande II es un embalse multipropósito que surte de agua a la planta de potabilización Manantiales, que provee de agua a 1.4 millones de habitantes (Palacio *et al.*, 2015) y alimenta la generación de las centrales Tasajera y Niquía.



Figura 4. Ubicación del embalse Riogrande II en el departamento de Antioquia (Colombia) (Vahos et al., 2011).

Las estaciones de muestreo se localizaron en los sitios definidos en el Proyecto de investigación “*Limnoecología, bioquímica y toxicidad de cianobacterias en tres embalses de Empresas Públicas de Medellín*” (*Figura 5 y Tabla 1*).

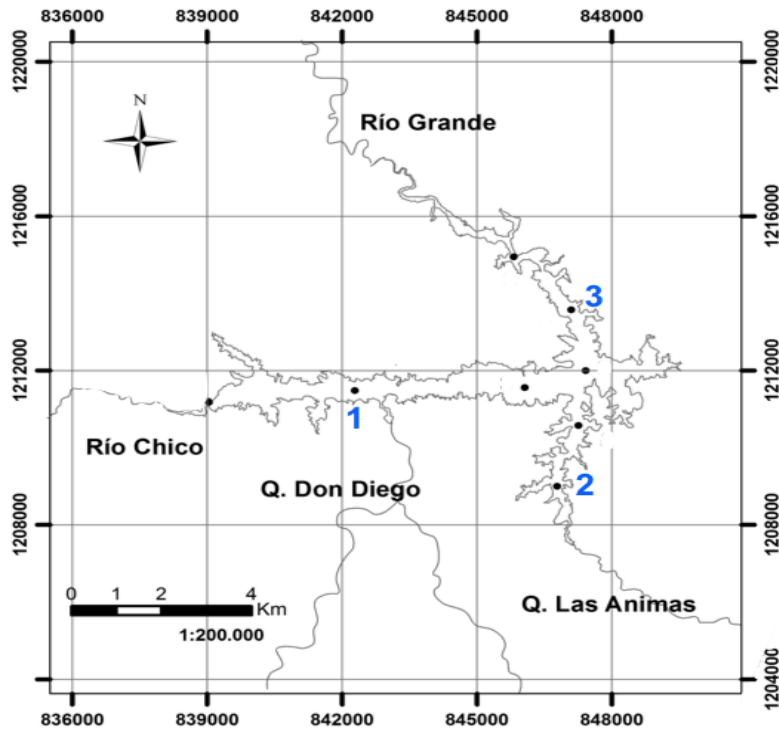


Figura. 5 Ubicación de las estaciones de muestreo (Elaborado por Sara Correa)

Tabla 1. Localización de las estaciones de muestreo

Estación	Latitud (N)	Longitud (W)	Descripción
1	6°30'34.128"	75°30'23.648"	Zona media del brazo de río Chico en la confluencia de la quebrada Yerbabuena y el río Chico
2	6°30'4.997"	75°27'41.9"	Brazo quebrada Las Ánimas, cercana a la torre de captación
3	6°31'42.523"	75°27'47.303"	Parte media brazo río Grande

8.2 Metodología de campo

En total se realizaron cuatro muestreos en cada una de las estaciones, con el fin de evaluar las condiciones fisicoquímicas y las características de las cianobacterias (Tabla 2). En cada estación se realizaron perfiles in situ con un perfilador CTD SBE-25 (Sea-Bird Electronics, 2013), con capacidad para medir temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/L), pH (Unidades de pH), conductividad eléctrica(S/m), potencial redox (mV), tramitancia (%) y turbiedad (NTU

) (Figura 6). La información sobre el volumen y el nivel de llenado (%) del embalse, sobre la variación multianual en el nivel del embalse entre 1992 y 2015 fue suministrada por Empresas Públicas de Medellín (EPM).

Como el procedimiento de cuantificación de la densidad y biomasa del fitoplancton demanda gran cantidad de tiempo, personal calificado y es costoso (Palacio, 2014), la cuantificación de un pigmento fotosintético presente en todas las especies de algas como la clorofila a puede ser un evaluador rápido de la biomasa algal (Manzi & Rodrigues, 2003; Andrinolo *et al.*, 2009; Rivera & Gómez, 2010; Hernández *et al.*, 2011). En consecuencia, se empleó un -Fluorómetro Fluoro Probe bbe (Figura 6) con factor de corrección MODC integrado para la corrección de sustancias amarillas (sustancias orgánicas disueltas) y la compensación de las interferencias por la radiación UV-LED y una resolución de 0,01 $\mu\text{g chl-a/L}$. Este equipo permite diferenciar cuatro grupos espectrales algales (Chlorophyta, Cyanobacteria Bacillariophyta/Dinophyta, y Criptophyta) en la columna de agua, basados en los distintos patrones de emisión de fluorescencia luego de la excitación a seis longitudes de onda (370nm, 470nm, 525nm, 570nm, 590nm y 610nm), determinadas por la composición de sus pigmentos antena. Este equipo mide temperatura de cero a 40 °C, transmitancia de cero a 100% y clorofila de 0 a 200 $\mu\text{g/l}$. (Gregor & Marsalek, 2004).

Tabla 2. Fechas muestreos

Muestreo	Fecha
1	5 diciembre de 2014
2	27 de marzo de 2015
3	30 de abril de 2015
4	11 de mayo de 2015

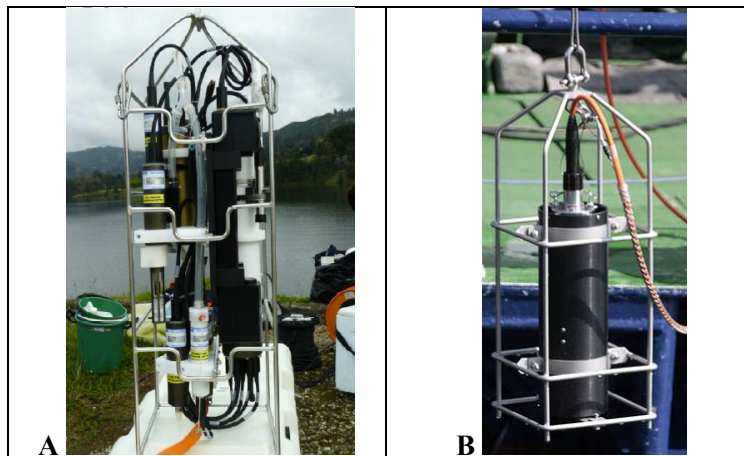


Figura 6. Perfilador CTD (A) y fluorómetro Fluoro Probe bbe (B) para el levantamiento de información de campo.

8.3 Toma y tratamiento de muestras de agua

Las muestras de agua fueron tomadas mediante una botella Van Dorn a la profundidad que en la zona fótica mostró la mayor concentración de clorofila del grupo espectral azul (entre los 0.1 y 2 m). El agua se almacenó y preservó según los requerimientos específicos para cada variable de acuerdo a APHA-AWWA-WPCF (2012) hasta su posterior análisis en el del Grupo GAIA de la Universidad de Antioquia. Mientras las muestras para los análisis de fósforo total y nitrógeno Kjeldahl se fijaron con ácido sulfúrico, para los análisis de hierro y manganeso el agua se fijó con ácido nítrico. Las muestras para el análisis de ortofosfatos se conservaron en refrigeración. Adicionalmente, se analizaron nitrógeno total disuelto, nitrógeno orgánico total disuelto, nitritos, nitratos y amonio por cromatografía iónica METROHM IC 850 en el laboratorio de calidad de aguas de EPM. Los métodos de análisis que se emplearon para los parámetros fisicoquímicos se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Métodos usados para el análisis de variables fisicoquímicas en agua.

Variable	Unidades	Método	Referencia
Fósforo total	mgP/L	Colorimétrico – ácido ascórbico	SM 4500-P-E
Ortofosfatos	mgP-PO ₄ /L	Colorimétrico	SM-4500-P-E
Hierro	mgFe/L	Absorción atómica	SM-3111-B
Nitrógeno orgánico total disuelto	mgN/L	Cromatografía iónica	ASTM D 5176-9
Nitratos	mgN-NO ₃ /L	Cromatografía iónica	SM 4110 B
Nitritos	mg N-NO ₂ /L	Colorimétrico	SM 4500-NO ₂ -B
Nitrógeno amoniacal	N-NH ₄ ⁺ /L ⁻¹	Cromatografía iónica	SM 4110 B

8.4 Determinación del potencial tóxico de cianobacterias.

8.4.1 Determinación del potencial tóxico:

En las tres estaciones se colectaron muestras de agua con una botella Van Dorn a la profundidad dentro de la zona fótica con mayor concentración de clorofila del grupo espectral azul (entre los 0.1 y 2 m). Para la determinación del potencial tóxico, las muestras se conservaron en recipientes tapa azul entre 4 y 8°C. En el laboratorio se filtraron 100 ml de agua a través de filtros de policarbonato de 0.45 µm y el material se almacenó en nitrógeno líquido (-195,8°C).

Las muestras, previamente filtradas y conservadas en nitrógeno líquido, fueron procesadas con el kit comercial PowerWater® DNA isolation (MO-Bio). Para amplificar la región del ADN perteneciente al gen de cianotoxinas *mcy*, se emplearon primers específicos para microcistinas (Tabla 4). A 30µl de reacción (15µl de PCR MasterMaster Mix (2X) Thermo Scientific, 3 µl del Forward y Reverse, 0.039 µl de BSA, 4 µl de DNA y 6.76 µl de H₂O para PCR) se aplicó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un termociclador MultiGene OptiMax (120V Labnet). Para la PCR se preincubaron los 30 µl de reacción 94°C durante 10 minutos, luego fueron sometidos a 35 ciclos de

amplificación alternados con 30 segundos de desnaturalización a 95°C y 30 segundos de amplificación a la temperatura estandarizada para cada primer (Tabla 12)

8.4.2 Verificación de la extracción de ADN.

Para la verificación de la extracción de ADN se empleó una cámara de electroforesis Labnet con un tamaño de gel de 7x10 cm. Para la preparación del gel se agregaron 60 ml de agar al 2% a la cámara de electroforesis y se dejó en reposo hasta la solidificación. Posteriormente, se sembró la muestra extraída con el kit PowerWater® DNA isolation y se sometió a un Voltaje de corrido de 90 voltios, una intensidad de corriente eléctrica de 800 mA y una potencia de 200 Watt durante 30 minutos y con una solución de corrido de TBE. Para la tinción del DNA se empleó Bromuro de Etidio al 5% y las bandas se observaron con una cámara de luz UV Spectroline modelo TD-2110E.

8.4.3 Diseño y chequeo de los primers

Dos de los cinco primers utilizados para la amplificación del gen de toxicidad *mcy*, fueron construidos en el laboratorio del grupo GAIA con el acompañamiento de profesor Carlos Muskus del grupo PECET de la Universidad de Antioquia. Para el diseño de los primers se buscaron las secuencias de interés del operón *mcy* en el GENBANK o en NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/> .Luego se guardaron las secuencias fasta y se exportaron al programa Clustal OMEGA: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, donde se alinearon todas las secuencias del operón *mcy* seleccionadas. En la opción “Result summary” se eligió Jalview para visualizar las secuencias y encontrar las regiones menos variables. Las regiones que cumplieron este requisito fueron exportadas al programa PRIMERPLUS: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> y se analizaron con las opciones: Pick left primer y pick right primer. Finalmente, se evaluó en cada primer la posición, longitud, Tm entre el Forward y el Reverse (la diferencia no puede alcanzar 1°C) y contenido de GC (la diferencia entre el Reverse y Forward no puede ser mayor al 5%).

Luego de la construcción de los primers se seleccionaron los oligos Forward y Reverse de interés, con el fin de verificar su selectividad y funcionalidad. Para este fin, se ingresó a la página web BLAST: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome y en el buscador se pegaron las secuencias Forward y Reverse de la siguiente manera: FORWARDnnnnnnnnnnREVERSE

Entre las opciones de búsqueda se seleccionaron Somewhat (Blast n), Word Size # 11 (para sondas pequeñas seleccionar # 7) y Expect Thereshold # 100 o # 1000, con el fin de analizar la selectividad y sensibilidad de los oligos con el gen blanco (gen *mcy*) para *Microcystis sp* y *Dolichospermum sp*. Luego del análisis de selectividad, se ingresó a la página web de OligoAnalyzer 3.1: <https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> y en el buscador se ubicaron las secuencias Forward de interés y se seleccionaron las opciones Hairpin, Self-Dimer y HeteroDimer. Al analizar el ΔG , se escogieron los oligos que tenían valores mayores a -7 Kcal/mol. Finalmente, en el buscador se ubicó la secuencia Reverse de interés y se tomaron las opciones Hairpin, Self-Dimer y HeteroDimer.

Cada primer se seleccionó según la especificidad o el análisis de selectividad con la secuencia blanco, gen *mcyE*, en la base de datos BLAST y selección de secuencias con mayor Score para unirse al gen *mcyE*. También se tuvo en consideración la efectividad o generación de horquilla (plegamiento de la secuencia), autodímeros o unión entre los mismo primers y heterodímeros o unión entre el primer Reverse y el primer Forward. Para este criterio se aceptaron los primers con un ΔG mayor a -7 Kcal/mol.

8.4.4 Verificación de la amplificación de primers.

Para la verificación de la amplificación de los primers se empleó la cámara de electroforesis descrita anteriormente. Para la preparación del gel se agregaron 60 ml de agar al 3% a la cámara de electroforesis y se dejó en reposo hasta la solidificación. Posteriormente, se sembraron las muestras amplificadas. Se usó un marcador de peso molecular Bioline y se sometió a un voltaje de corrido de 80 voltios, una intensidad de corriente eléctrica de 800 mA y una potencia de 200 Watt durante 51 minutos y con una solución de corrido de TBE. Para la tinción del DNA se utilizó bromuro de edio al 5% y las bandas se observaron con una cámara de luz UV Spectroline modelo TD-2110E.

Algunos de los primers fueron diseñados en el laboratorio GAIA y otros se seleccionaron a partir de la información bibliográfica (Valério *et al.*, 2010., Fortin *et al.*, 2010., Sipari *et al.*, 2010., Qiu *et al.*, 2013). Aunque inicialmente se consideraron los primers empleados por Hurtado (2014), posteriormente fueron descartados debido a que no cumplieron con los criterios de especificidad y efectividad definidos en este estudio.

8.5 Abundancia de cianobacterias nostocales y chroococcales

Para los análisis cualitativos y cuantitativos de las cianobacterias se siguió la metodología aplicada por Palacio *et al.*, (2015). Las muestras se fijaron con Etanol al 96% y PBS 1X, luego se sedimentaron con Lugol, se llevaron a una cámara Sedgwick-Rafter y se cuantifico la densidad a través de la observación en un microscopio invertido (Leica DMIN) a 400X. Mediante el empleo del método de campos aleatorios, se contaron 100 individuos (colonias o filamentos) del taxón más abundante y a bajas densidades se observaron 60 campos. El volumen celular medio de las cianobacterias se calculó a partir de las dimensiones de al menos 30 células o individuos de cada taxón, seleccionados aleatoriamente. La biomasa total de cada taxón se obtuvo como el producto de la densidad absoluta (ind/mL), el número medio de células de las colonias o filamentos y el biovolumen celular medio (Palacio *et al.*, 2015).

Tabla 4. Primers para la detección del gen *mcy* en *Microcystis sp* y en *Dolichospermum sp*.

FUENTE	PRIMERS	TAMAÑO DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN (pb)	NCBI BLAST (SELECTIVIDAD DEL PRIMER)
(Fortin <i>et al.</i> , 2010)	F: 5'-TGGGGATGGACTCTCTCACTTC -3', R: 5'-GGCTTCAACATTCGGAAAAACG-3'.	107	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> y <i>Thermocrinis albus</i>
(Fortin <i>et al.</i> , 2010)	F: 5'-TACGGGAGTAACTTTTCGGCTCA-3', R: 5'-ACAAGCATCTAACATAGCGGGA-3'	129	<i>Microcystis (mcyD)</i> , <i>Paenibacillus sp</i> , <i>Wolbachia sp</i>
(Sipari <i>et al.</i> , 2010)	F: 5'-CTAGAGTAGTCACTCACGTC-3', R: 5'-GGTCTTGATAGTTAGATTGAGC-3'.	127	<i>Anabaena (mcyE)</i> , <i>Aliivibrio salmonicida</i> (Agua marina), <i>Liberibacter crescens</i> (Fitopatígeno de cítricos), <i>Streptococcus suis</i> (Enfermedad en marranos)
Diseño #1 (PRIMER BLAST)*	F: 5'-TTTGATGGCATTTTAGCCCGC -3', R: 5'-GGCTCTGCACAGTTCTACT -3'.	184	Diseño de Primers para el <i>mcyE</i> de <i>Anabaena</i> (Cyanobacteria)
Diseño #2 (PRIMER BLAST)*	F:5'-CAGCAACAAATGCAACACGGA -3', R: 5'-AGCGACTCGTTCTACACCTG-3'.	102	Diseño de Primers para el <i>mcyE</i> de <i>Anabaena</i> (Cyanobacteria)

8.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se construyó una matriz con la fecha del muestreo, la estación, la profundidad, resultados de las variables físicas y químicas y de los conteos de cianobacterias con potencial tóxico. Inicialmente, se realizó un análisis descriptivo y luego se aplicó una correlación de Spearman entre las variables fisicoquímicas, la densidad y biovolumen total de las cianobacterias presentes en el embalse. El análisis se realizó con el software R Studio Version 0.99.896 – © 2009-2016.

9. RESULTADOS

9.1 Precipitación y nivel del embalse

En la Tabla 5 se presentan el volumen y el nivel de llenado (%) del embalse y en la Figura 7 se ilustra la variación multianual en el nivel del embalse entre 1992 y 2015. Los resultados del volumen de agua y del nivel del embalse indican que mientras el muestreo de diciembre de 2014 se realizó en una época de aguas altas, los otros tres muestreos correspondieron a un periodo predominantemente de aguas bajas en marzo y mayo de 2015 y de condiciones intermedias en abril de 2015. Al comparar el nivel de llenado del embalse durante los muestreos con el promedio histórico, se evidencia que en general el sistema presentó una condición típica para cada época, pero con niveles inferiores a los históricos entre marzo y mayo.

Tabla 5. Volumen (m³) y nivel de llenado (%) de almacenamiento durante los muestreos en el embalse Riogrande II (EPM, 2015).

Fecha	Volumen [m ³ x 10 ³]	Nivel [%]
05 diciembre	172,25	92,89
27 marzo	92,59	49,93
30 abril	106,35	57,35
11 mayo	88,95	47,97

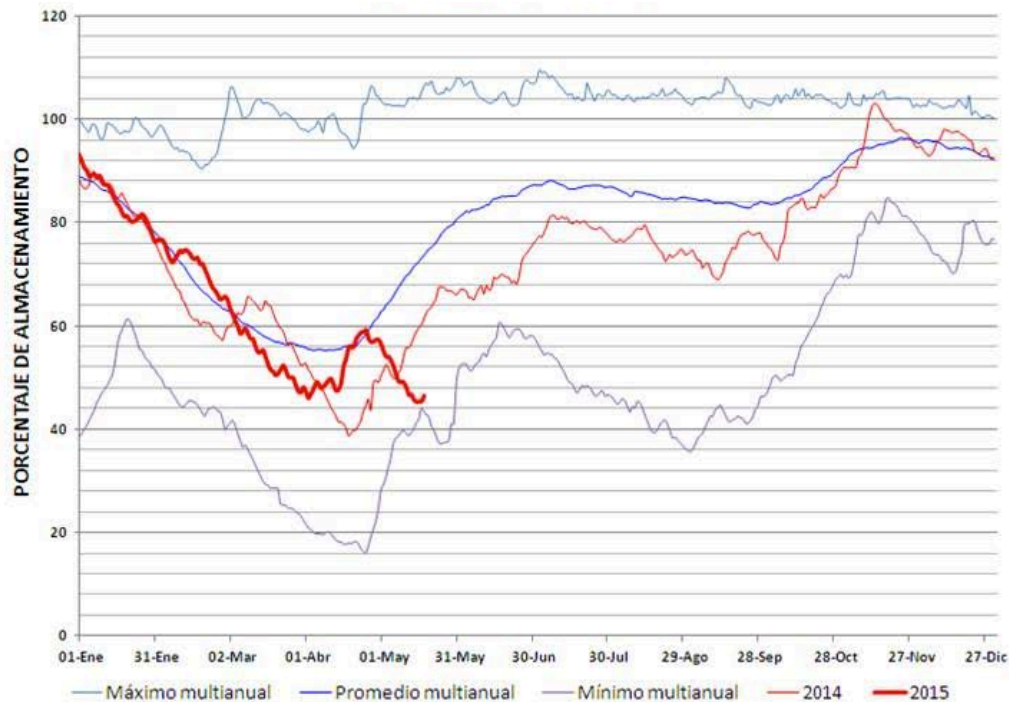


Figura 7. Variación multianual en el almacenamiento del embalse Riogrande II 1992 – 2015.

9.2 Variables Físicoquímicas y clorofila a

Como se observa en la Tabla 6, la profundidades con mayor concentración de clorofila a del grupo espectral azul ($\mu\text{g/l}$) vario a través del periodo de muestreo y entre las estaciones. Adicionalmente, los valores de clorofila a del grupo espectral azul en la columna de agua fluctuaron en forma significativa en el tiempo entre $20 \mu\text{g/l}$ a $0.1 \mu\text{g/l}$ y variaron en el espacio. Mientras en la estación 2 (Parte media del brazo del río Grande) el valor máximo de clorofila a del grupo azul fue ligeramente superior a $0,30 \mu\text{g/l}$, en la estación 1 (zona media del brazo del río Chico) alcanzó en promedio $10,20 \mu\text{g/l}$ y fluctuó ampliamente entre $1,74$ en marzo de 2015 y $22,72 \mu\text{g/l}$ en abril de este mismo año.

Tabla 6. Profundidad con mayor concentración de clorofila a del grupo espectral azul en ($\mu\text{g/l}$) por muestreo y estación en el embalse Riogrande II.

MUESTREO	Diciembre 5 de 2014			Marzo 27 de 2015			Abril 30 de 2015			Mayo 11 de 2015		
ESTACIÓN	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Profundidad de muestreo (m)	0.43	0.15	1.05	1,72	1,42	1,13	0.76	0.23	0.24	1.13	1.18	1
Concentración de clorofila a del grupo espectral azul ($\mu\text{g/l}$)	3.72	0	9.24	1.74	0.39	3.13	22.72	0	14.35	7.98	0	0

En la **Tabla 7** se presentan los resultados de las variables físicoquímicas en la profundidad de mayor biomasa de cianobacterias. Mientras la transparencia del agua fluctuó entre $0,34 \text{ m}$ en la estación uno (Zona media del brazo de río Chico) en diciembre de 2014 y $2,68 \text{ m}$ en la parte media del brazo del río Grande (estación tres) en este mismo mes, la temperatura del agua osciló entre $18,6$ en la parte media del brazo del río Grande en abril del 2015 y $20,38 \text{ }^\circ\text{C}$ en Zona media del brazo de río Chico en este mismo mes. La conductividad del agua se mantuvo relativamente estable y no mostró diferencias importantes en el espacio y en el tiempo, vario desde $48,86 \text{ uS/cm}$ en la parte media del brazo del río Grande en diciembre del 2014 y abril del 2015 hasta $65,72$ en la zona media del brazo de río Chico en mayo. El pH del agua varió estrechamente entre $9,23$ unidades en la zona media del brazo de río Chico en diciembre de 2014 y $9,86$ en esta misma la estación en mayo de 2015. Los resultados del pH, superiores a $9,0$ unidades, indican niveles altos de producción en la zona fótica del embalse.

La concentración del nitrógeno total disuelto fluctuó entre $0,37$ en la estación 3 en abril y $2,33 \text{ mg/l}$ en la estación 2 (Brazo quebrada las Animas). Por su parte, el nitrógeno orgánico total disuelto oscilo entre $0,11$ en la estación uno en mayo y $0,40$ en la estación 2 en marzo. En general, se observaron bajas concentraciones del nitrógeno amoniacal y un aporte significativo de los nitratos al nitrógeno total en las estaciones 2 y 3 en el muestreo de mayo.

Los valores de fósforo total se mantuvieron constantes, variaron entre 0.08 mgP/L en la estación 1 durante el muestreo de diciembre hasta 0.02 mgP/L en la estación 2 en mayo. Por su parte, el ortofosfatos también mostró rango estrecho, fluctuó entre $0.03 \text{ mg-PO}_4\text{/L}$ en la estación 1 en diciembre y $0.00 \text{ mg-PO}_4\text{/L}$ en las estaciones 2 y 3 en diciembre,

marzo y abril. Estos valores son similares a los reportados por Palacio *et al.*, (2014). El hierro fluctuó entre 0.58 mgFe/L en la estación 3 en abril y 0.1 mgFe/L en la estación 2 en diciembre.

Tabla 7. Variables fisicoquímicas en la profundidad de mayor concentración de clorofila a ($\mu\text{g/l}$) en el embalse Riogrande II.

ESTACIÓN	MUESTREO											
	Diciembre			Marzo			Abril			Mayo		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Profundidad máxima (m)	30,20	7,70	8,00	24,30	8,70	21,80	26,30	26,70	18,70	15,30	18,27	15,20
Transparencia Secchi (m)	0,34	0,74	2,68	1,19	1,17	1,14	1,15	1,90	1,50	1,66	1,70	1,30
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	19,98	19,99	19,03	20,18	19,83	19,67	20,38	20,09	18,16	21,17	20,17	20,10
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	50,87	55,00	48,00	57,00	56,33	48,86	57,00	55,00	48,00	65,72	54,80	48,10
pH (Unidades de pH)	9,23	9,85	9,50	9,40	9,97	9,62	9,40	9,85	9,50	9,86	9,83	9,45
Clorofila a cianobacterias ($\mu\text{g/L}$)	3.72	0	9.24	1.74	0.39	3.13	22.7	0	8.19	7.98	0	0
Nitrógeno total disuelto *	-	-	-	0.48	1.02	0.47	0.39	0.41	0.37	1.74	2.33	1.25
Nitrógeno orgánico total disuelto (mgN/L) *	-	-	-	0,36	0,40	0,34	0,31	0,35	0,27	0,11	0,15	0,28
Nitratos ($\text{mgN-NO}_3/\text{L}$) *	-	-	-	0,12	0,62	0,09	0,06	0,04	0,07	0,16	0,53	0,48
Nitritos ($\text{mg N-NO}_2/\text{L}$) *	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0,04	0,03	0,04
Nitrógeno amoniacal ($\text{N-NH}_4^+/\text{L}^{-1}$) *	-	-	-	0	0	0,04	0,02	0,02	0,03	1,43	1,62	0,45
Fósforo total (mgP/L)	0,08	0,03	0,04	0,07	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,02	0,04
Ortofosfatos ($\text{mgP-PO}_4/\text{L}$)	0,03	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
Hierro (mgFe/L)	0,10	< 0,1	0,21	0,35	0,30	0,28	0,40	0,23	0,58	0,43	0,31	0,55

* No se midieron en diciembre.

9.3 Abundancia de cianobacterias Nostocales y Chroococcales.

En la Tabla 8 se señalan los morfotipos, la densidad de células (células/ml) y el biovolumen (mm^3/L) de las cianobacterias Nostocales y Chroococcales colectados en las tres estaciones del embalse Riogrande II entre diciembre 2014 y mayo 2015. En el embalse se encontraron cinco morfoespecies de cianobacterias (*Aphanocapsa*, *Dolichospermum sp.1*, *Microcystis wesenbergii*, *Sphaerospermopsis*, *Microcystis aeruginosa*) durante el periodo de estudio. Mientras la densidad total de células, sin considerar *Aphanocapsa*, fluctuó entre 218 en diciembre en la estación dos y 15,416 cel/ml en mayo en la estación tres, el biovolumen vario entre 0.08 y 6.49 mm^3/L en los mismos muestreos y

estaciones. Al considerar la densidad y el biovolumen de los diferentes morfotipos, se evidencia que *Sphaerospermopsis Dolichospermum sp.1 Microcystis wessenbergii* realizaron los mayores aportes a la densidad total de células (Figuras 8 y 9)

Tabla 8. Abundancia de nostocales y chroococcales en tres estaciones en el embalse Riogrande II.

ESTACIÓN	MUESTREO	MORFOTIPO	Organismos/ ml	Cel/ml	Total cel/ml por muestreo	Biovolumen	Total biovolumen por muestreo
1	DICIEMBRE	<i>Aphanocapsa</i>	3				
	MARZO	<i>Dolichospermum sp.1</i>	3	284	1,111	0.11	0.52
		<i>Microcystis wesenbergii</i>	3	827		0.42	
	ABRIL	<i>Sphaerospermopsis</i>	34	2,178	3,572	0.81	1.44
		<i>Microcystis wesenbergii</i>	3	827		0.42	
		<i>Dolichospermum sp.1</i>	7	568		0.21	
	MAYO	<i>Sphaerospermopsis</i>	54	2,178	13,763	0.81	5.65
		<i>Aphanocapsa</i>	27				
		<i>Microcystis wesenbergii</i>	17	4,133		2.09	
		<i>Dolichospermum sp.1</i>	3	7,453		2.76	
2	DICIEMBRE	<i>Sphaerospermopsis</i>	3	218	218	0.08	0.08
	MARZO		0				
	ABRIL	<i>Dolichospermum sp.1</i>	3	7,453	7,453	2.76	2.76
	MAYO	<i>Microcystis wesenbergii</i>	7	1,653	14,168	0.83	5.56
		<i>Microcystis aeruginosa</i>	7	2,884		1.16	
		<i>Sphaerospermopsis</i>	14	2,178		0.81	
		<i>Dolichospermum sp.1</i>	3	7,453		2.76	
	<i>Aphanocapsa</i>	14					
3	DICIEMBRE	<i>Aphanocapsa</i>	10		7,453		2.76
		<i>Dolichospermum sp.1</i>	3	7,453		2.76	
	MARZO	<i>Aphanocapsa</i>	10		436		0.16
		<i>Sphaerospermopsis</i>	7	436		0.16	
	ABRIL	<i>Aphanocapsa</i>	27		2,480		1.25
		<i>Microcystis wesenbergii</i>	10	2,480		1.25	
	MAYO	<i>Sphaerospermopsis</i>	54	2,178	15,416	0.81	6.49
		<i>Microcystis wesenbergii</i>	24	5,786		2.92	
<i>Aphanocapsa</i>		7					
<i>Dolichospermum sp.1</i>		7	7,453	2.76			

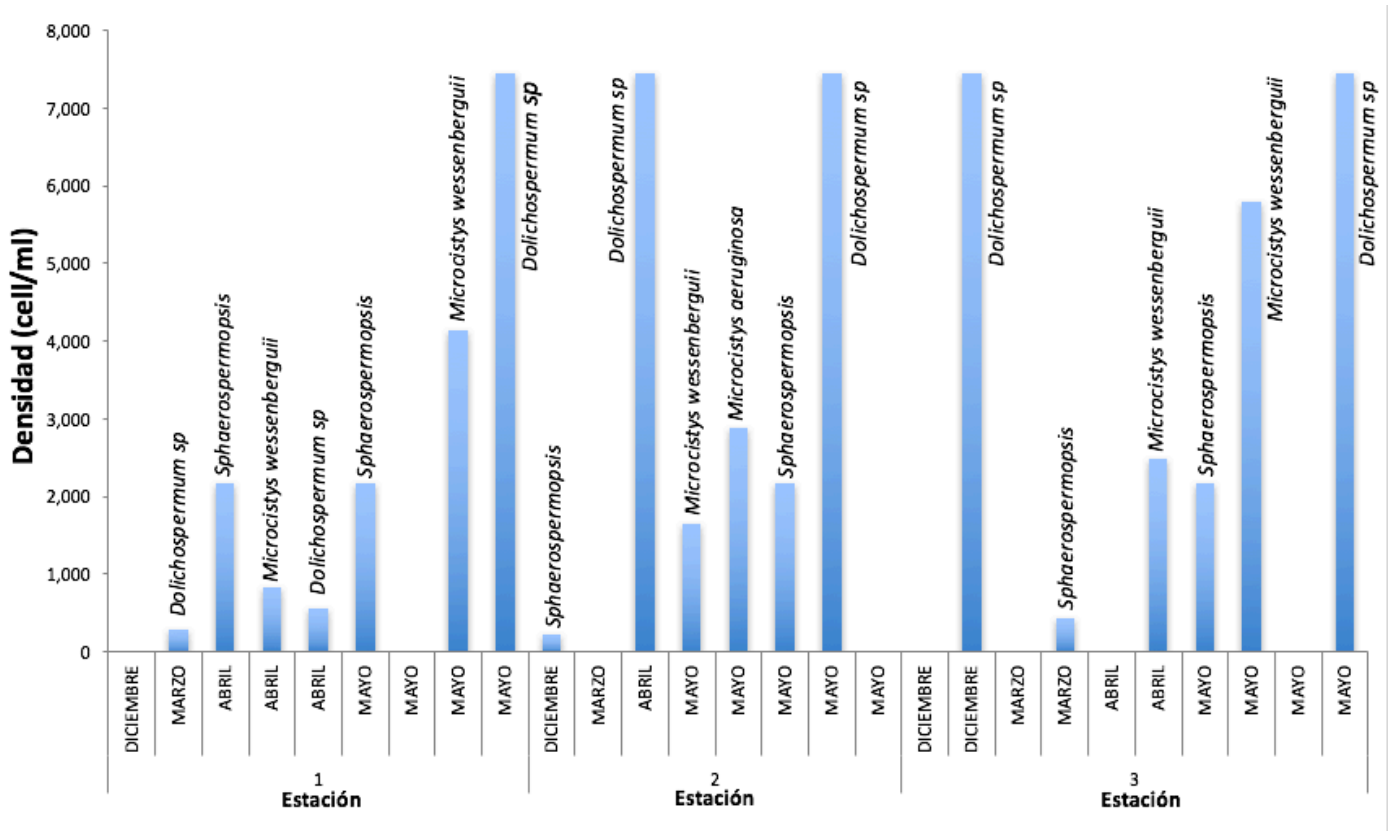


Figura 8. Densidad de cianobacterias en tres estaciones en el embalse Riogrande II.

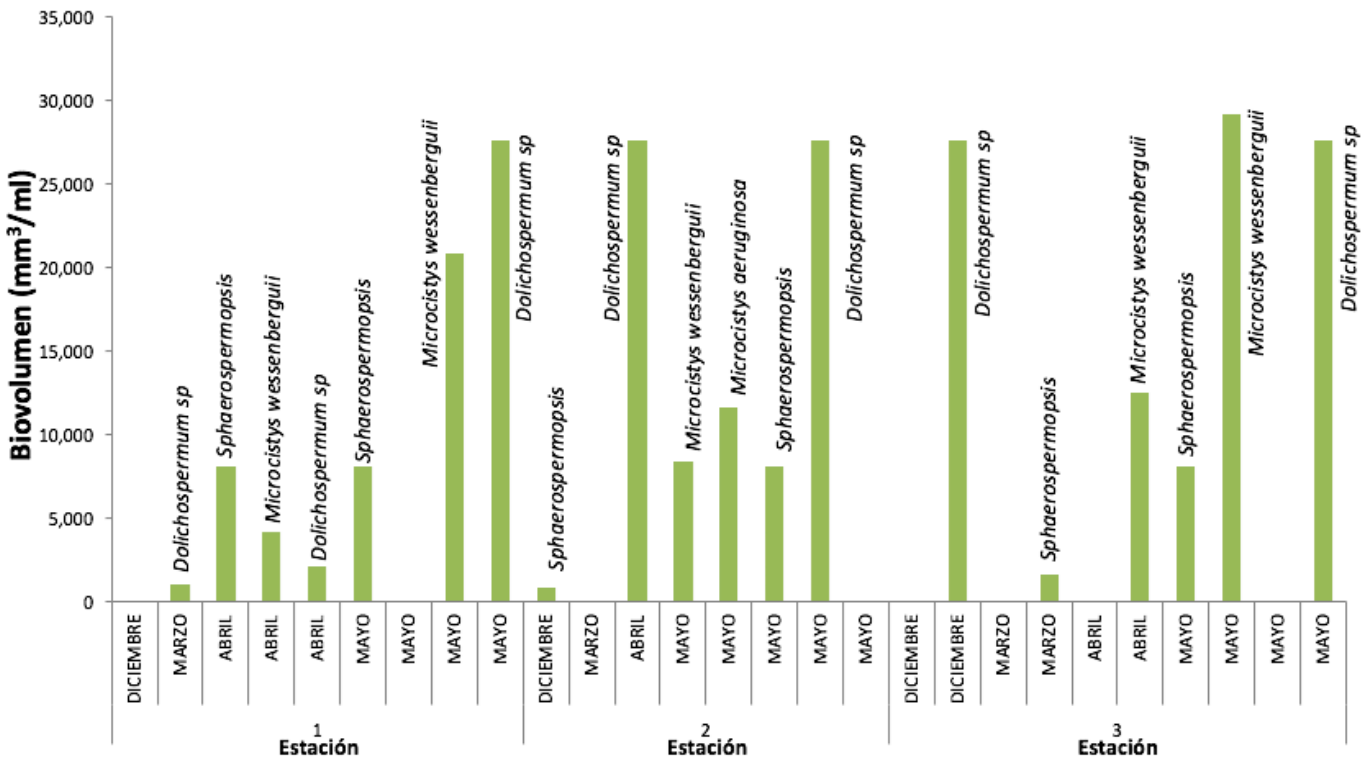


Figura 9. Biovolumen de cianobacterias en tres estaciones en el embalse Riogrande II.

En la figura 10, se ilustra el comportamiento de la clorofila a de los diferentes grupos espectrales y de la clorofila a total a través de la columna de agua en el brazo medio del río Chico. En general, en la zona fótica de la estación uno la clorofila a total supero 20 $\mu\text{g/l}$ y fue considerablemente más elevada en los muestreos de aguas bajas o intermedias (marzo, abril y mayo de 2015) que en el periodo de aguas altas (diciembre 2014). Mientras en la zona fótica el valor de la clorofila a total alcanzo valores cercanos a 60 $\mu\text{g/l}$ en marzo y abril y a 50 $\mu\text{g/l}$ en mayo, en diciembre no superó los 25 $\mu\text{g/l}$. Como se evidencia en la figura 10, en los muestreos de diciembre y marzo el grupo espectral verde contribuyo en forma considerable a la biomasa de fitoplancton en la estación 1 y el grupo azul mostro valores relativamente bajos de clorofila a. Al desaparecer en abril las cloroficeas, las cryptofitas y en menor proporción las cianofitas, fueron responsables de las elevadas concentraciones de clorofila a en la estación uno. Finalmente, en mayo las clorofitas aportaron la mayor fracción a la clorofila a total.

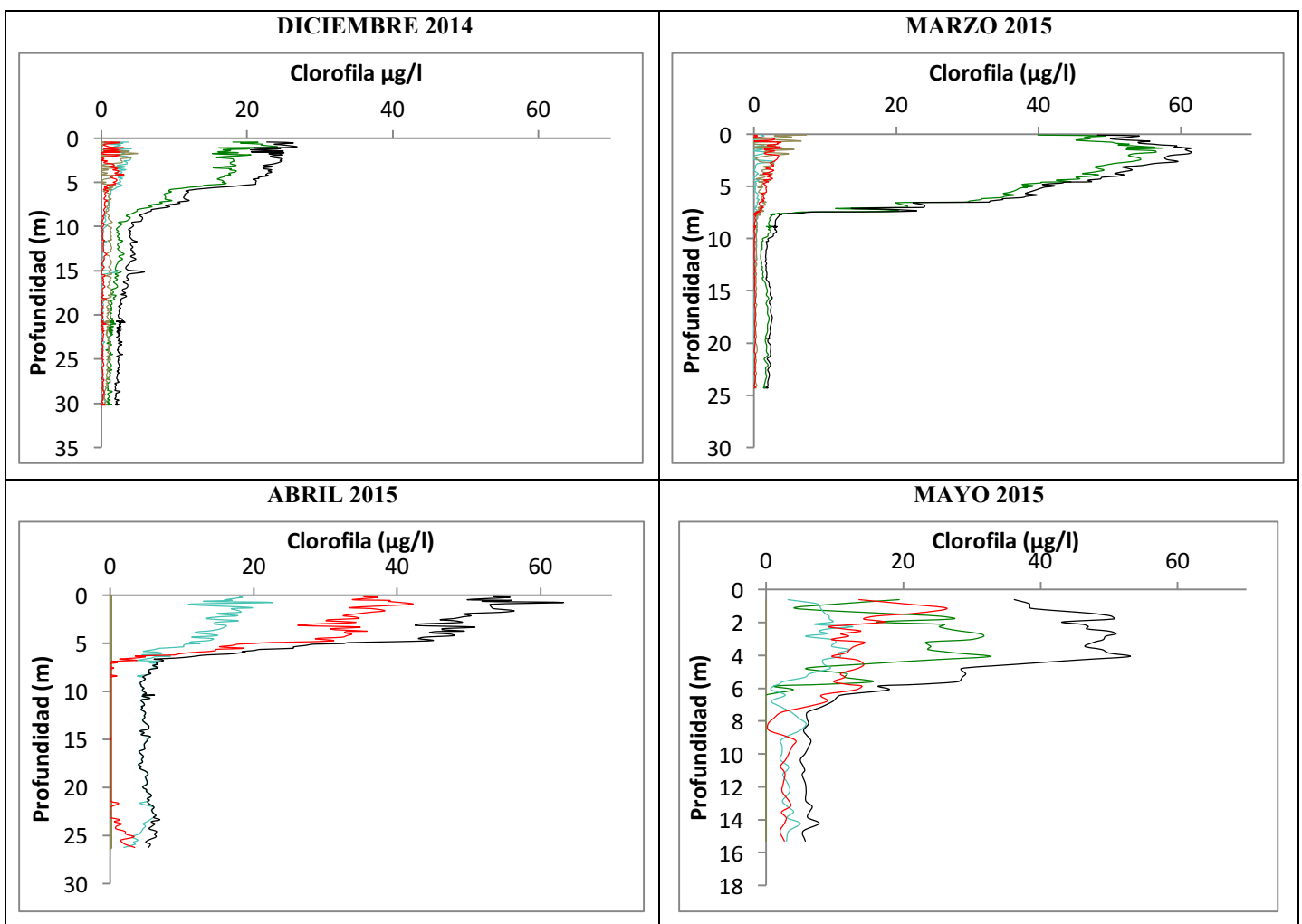


Figura 10. Contribución de las clorofitas (■), cianofitas (■), diatomeas (■) y cryptofitas (■) a la clorofila a total (●) en la estación 1.

En la figura 11, se presentan los resultados de la contribución de los diferentes grupos espectrales a la clorofila a total a través de la columna de agua en el brazo de la quebrada las Ánimas entre diciembre de 2014 y marzo de 2015. Como se señaló anteriormente para el brazo medio del río Chico, los valores de clorofila a total en la zona fótica del brazo de la quebrada las Animas superaron los 20 $\mu\text{g/l}$ y fueron también considerablemente mayores durante el periodo de aguas bajas o nivel intermedio (marzo, abril y mayo de 2015) en relación al muestreo de aguas altas (diciembre 2014). Mientras la concentración de clorofila a total alcanza una concentración superior a 60 $\mu\text{g/l}$ en marzo, abril y mayo, en diciembre no superó los 20 $\mu\text{g/l}$. Aunque en los cuatro muestreos el grupo espectral verde contribuyó sustancialmente a la biomasa de fitoplancton en esta la estación, en mayo fueron importantes las cryptofitas. Por su parte, el grupo azul mostro valores bajos de clorofila a. en todos los muestreos.

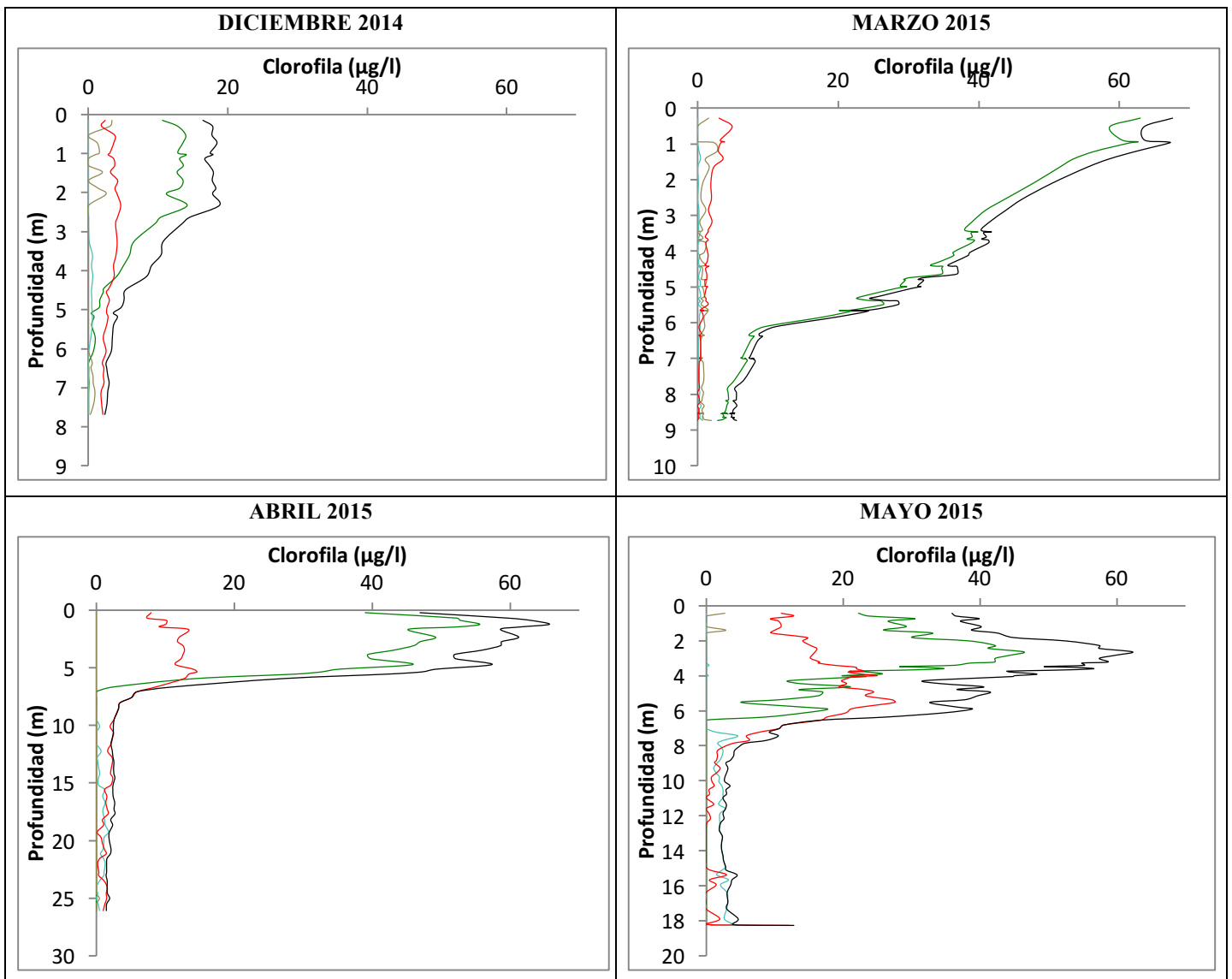


Figura 11. Contribución de las clorofitas (■), cianofitas (■), diatomeas (■) y cryptofitas (■) a la clorofila a total (●) en la estación 2.

En la figura 12 se muestra la contribución de los diferentes grupos espectrales a la clorofila a total a través de la columna de agua en el brazo medio del río Grande. Los valores de clorofila a total en la zona fótica de esta estación superaron los 40 $\mu\text{g/l}$ en los muestreos correspondientes a aguas bajas o nivel intermedio de llenado del embalse (marzo, abril y mayo de 2015) y alcanzaron valores superiores a 35 y cercanos a 40 $\mu\text{g/l}$ durante el periodo de aguas altas (diciembre 2014). Mientras en los muestreos de marzo y mayo del 2015 el grupo espectral verde contribuyó en forma considerable a la biomasa de fitoplancton en la zona fótica de esta estación, en diciembre y en abril las cryptofitas fueron responsables en gran parte de los valores de clorofila a total. Por su parte, el grupo espectral azul mostro valores muy bajos de clorofila a. en marzo y en mayo.

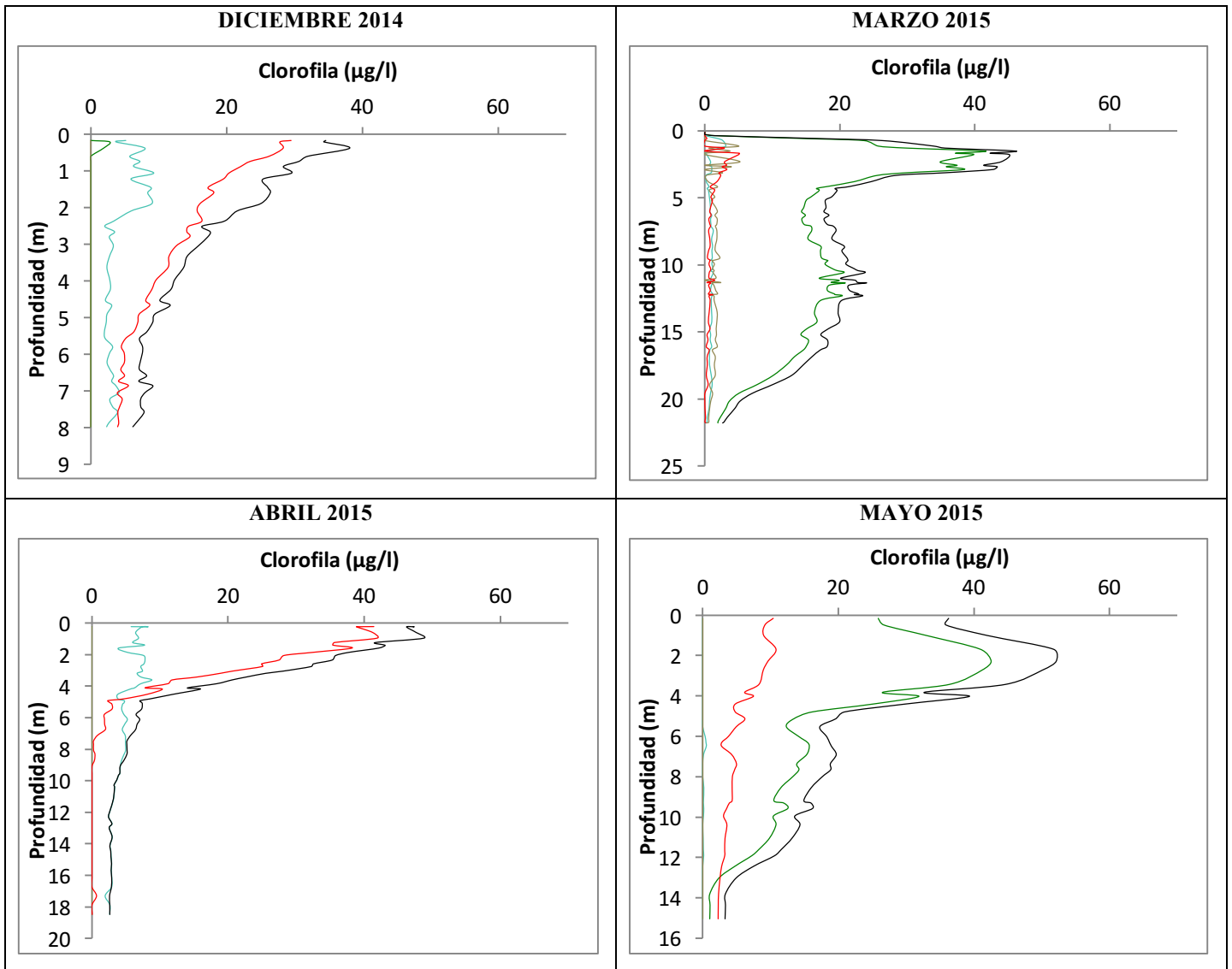


Figura 12. Contribución de las clorofitas (■), cianofitas (■), diatomeas (■) y cryptofitas (■) a la clorofila a total (●) en la estación 3.

En las figuras 13,14 y 15 se ilustra el comportamiento de la clorofila a del grupo espectral azul a través de la columna de agua en las tres estaciones durante los cuatro muestreos. Solo en el brazo medio del río Chico en abril la clorofila a del grupo azul alcanzo valores ligeramente superiores a 20 $\mu\text{g/l}$. En general, en el resto de muestreos y estaciones la oncentración de clorofila a del grupo azul no superó los 10 $\mu\text{g/L}$ e incluso en el brazo de la quebrada las Animas se mantuvo por debajo de 5 $\mu\text{g/L}$.

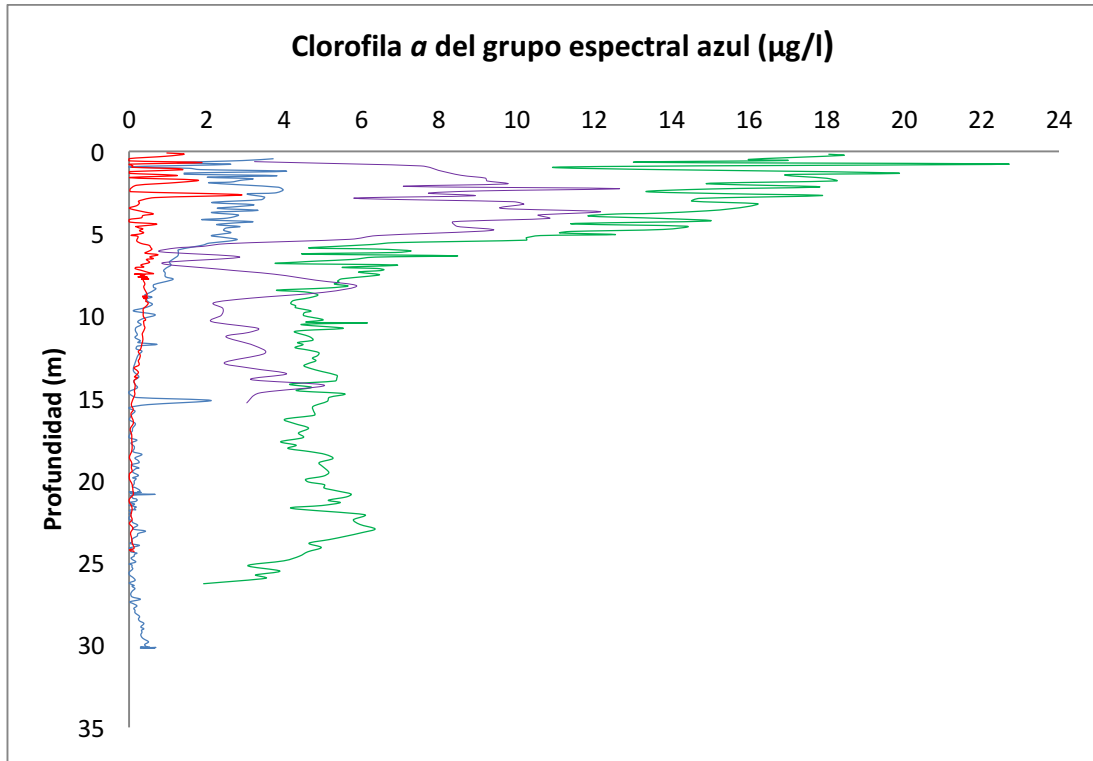


Figura 13 Clorofila a del grupo espectral azul en la estación 1 en diciembre de 2014 (—), marzo (—), abril (—) y mayo (—) de 2015.

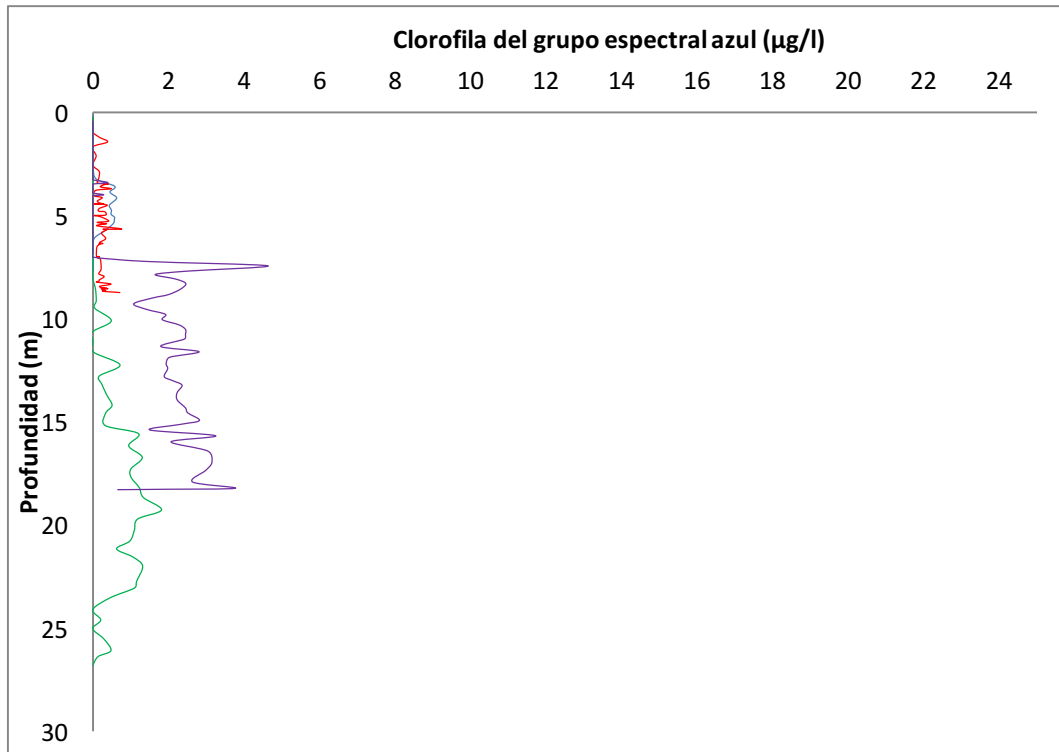


Figura 14 Clorofila a del grupo espectral azul en la estación 2 en diciembre de 2014 (—), marzo (—), abril (—) y mayo (—) de 2015.

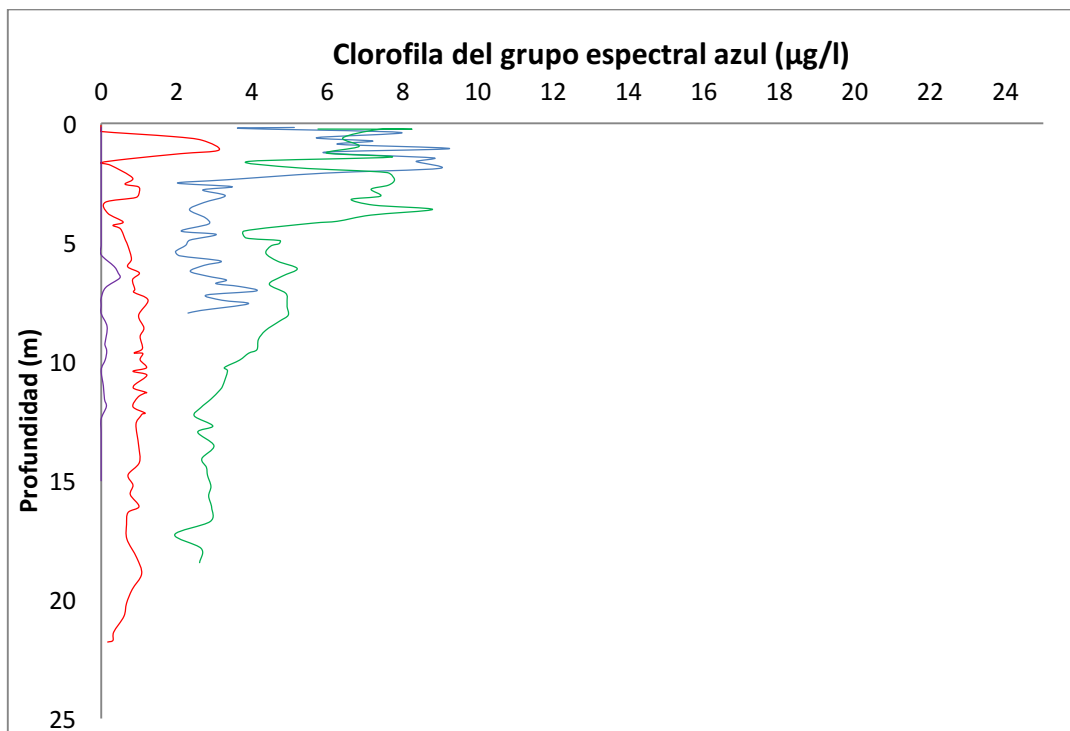


Figura 15 Clorofila a del grupo espectral azul en la estación 3 en diciembre de 2014 (—), marzo (—), abril (—) y mayo (—) de 2015.

9.4 Potencial Tóxico

Selección de Primers

Para el diseño de los primers se buscaron secuencias en NCBI del operón *mcy*. Mientras para el gen *mcyE* de *Microcystis* se seleccionaron 24 secuencias entre 200 a 500 pares de bases (pb), para el gen *mcyE* de *Anabaena* 23. Las alineaciones que se obtuvieron en el programa Clustal OMEGA para el orden Chroococcales (*Microcystis*) y el orden Nostocales (*Anabaena*) se presentan en la Figura 16 y Figura 17, respectivamente.

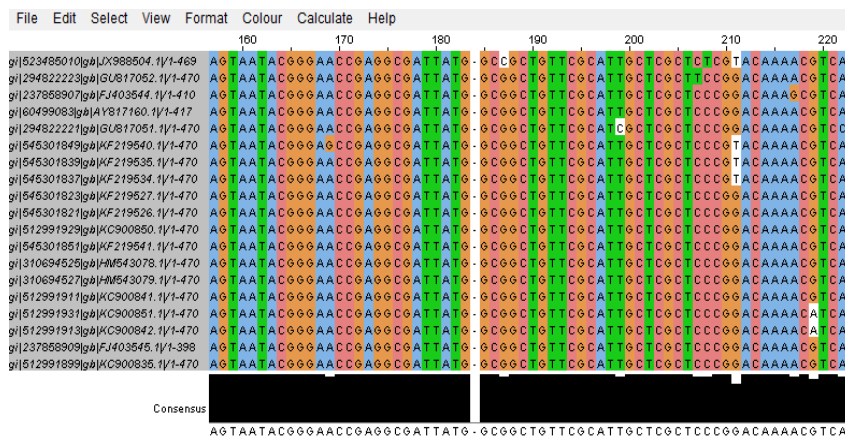


Figura 16 Alineación de las secuencias del gen *mcyE* para *Microcystis* (Fuente: Jalview, ClustalOmega)

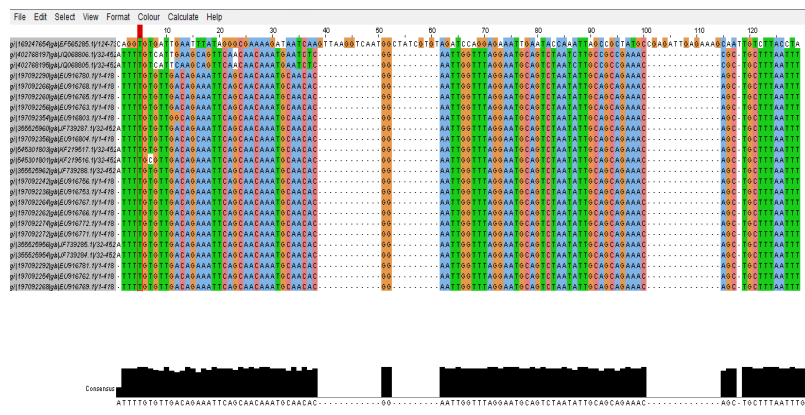


Figura 17 Alineación de las secuencias del gen *mcyE* para *Anabaena* (Fuente: Jalview, ClustalOmega)

Posterior a la alineación se escogieron las cadenas más conservadas, es decir las secuencias que más se repitieron entre las 24 o 23 alineadas. Para el orden Chroococcales (*Microcystis*) se obtuvo la siguiente secuencia: TTTGGGGTTAACTTTTTTGGCCATAGTCCTGATTTTGTTCATTGAAGCAGTTCAAGAGCAAATGAATCGAGGAA TAGGCTTAGGAATGCAGTCAAATCTGGCCGCCGAAACCGCCGCTTAAATTAGTGAATGGGCCGAGTCGAAA GAGTCGCTTTTAGTAATACGGGAACCGAGGCGATTATG- GCGGCTGTTCCGATTGCTCGCTCCCGACAAAACGTCAAAAATCGTTATGTTTGCCGGCTCCTATCATGGAA

CTTTTGACGGCATCTTAGCACGAGTAGGAGAAGATAAAAACCACTGCTCAACCCTTAAGTCTAGGCACCCCTTT
 AGGAATGGTTGAAGACGTAATAGTCTTGAGTTATGGAGTTGAAGAAAGCCTCGATATTATTGCTACTCATGCT
 GATGATTTAGCCGCCGTATTAGTCGAACCAGTTCAAAGTCGCAAACCCGATTTACAGCCTCAAGAATT. Para el
 orden Nostocales (*Anabaena*) se seleccionó la secuencia: -
 TTTTGTGTTGACAGAAATTCAGCAACAAATGCAACAC-----GG-----
 AATTGGTTTAGGAATGCAGTCTAATATTGCAGCAGAAAC-----AGC-TGCTTTAATTTGTGAAA---
 TGACAGGTGTAGAACGAGTCGCTTTTAGTAATACTGGTACAGAAGCGATTATGGCAGCAGTTCGTATTGCTCG
 TTCTCGGACAAAACGCCAAAAAATTGTGATTTTTGCTGGTTCTTATCACG-----
 GTACTTTTGTATGGCATTTTAGCCCGCGCTGGCGAGGAAGTAGGAACAGCTGAACCATTGAGTCTTGGTACACC
 A-----
 TCAGGAATGGTTGAAGATGTTATAGTTCTTACCTATGGAGCGGAAGAAAGTCTAGAAATAATTG-----
 CAGAGCAAGCTGAT-----AATTTAGCAGCAGTTTTAGTAGAACCT-----
 GTGCAGAGCCGTAAACCA-

Las regiones menos variables se exportaron al programa PrimerPlus y se analizaron los posibles primers que generó el software bajo los criterios descritos en la metodología. Los 10 primers construidos para el orden Chroococcales (*Microcystis*) fueron descartados porque ninguno tuvo buena especificidad para el operón *mcyE* de éste género. De los 10 primers construidos por el PrimerPlus para el orden Nostocales (*Anabaena*), sólo 3 tuvieron alta especificidad. De acuerdo a los resultados de la Tabla 9 el análisis de la especificidad y efectividad de los tres primers seleccionados indicó que los criterios evaluados son adecuados para los primers 5 y 10, pero el primer 9 tuvo una alta probabilidad de generar heterodímeros y unirse a otros microorganismos presentes en las muestras de agua del embalse Riogrande II.

Tabla 9 Análisis de Especificidad y Efectividad para los primers del orden Nostocales (*Anabaena*)

PRIMER	Especificidad BLAST	Horquilla [F]	Autodímero [F]	Heterodímero	Horquilla [R]	Autodímero [R]
5	Alta especificidad	-2.61	-7.05	-6.69	-1.71	-6.69
9	Alta especificidad (Pero se une a otros microorganismos propios del embalse Riogrande II)	-2.02	-6.21	-7,81	-0.22	-7.05
10	Alta especificidad	-2.61	-7.05	-4.95	0.13	-5.19

Para el orden Nostocales los primers diseñados que cumplieron los criterios de evaluación fueron: 1F: 5'-TTTGATGGCATTTTATAGCCCGC -3', 1R: 5'-GGCTCTGCACAGGTTCTACT -3' y 2F: 5'-CAGCAACAAATGCAACACGGA -3', 2R: 5'-AGCGACTCGTTCTACACCTG-3'.

La selección de las secuencias disponibles en la literatura se hizo teniendo en consideración los criterios de especificidad y efectividad descritos anteriormente en la metodología. En la Tabla 10 se presenta el listado de las referencias bibliográficas consultadas. El texto resaltado en rojo corresponde a los resultados que no cumplieron alguno de los criterios de evaluación. En el presente trabajo se seleccionaron los dos primers de Fortin et al. (2010) y el de Sipari et al. (2010).

Tabla 10 Análisis de Especificidad y Efectividad para primers de la literatura

Fuentes Bibliográficas	OLIGO (F,R)	CARACTERÍSTICAS	
(Valerio <i>et al.</i> , 2010)	F 5'AAAATTTAAAAGCCGTATCAAA' R5'AAAAGTGTTTTATTAGCGGCTCAT	Horquilla F	2.51 kcal/mol
		Autodímeros F	-5.36 kcal/mol
		Heterodímeros	-11.42 Kcal/mol
		Horquilla R	0.05 kcal/mol
		Autodímeros R	-5.83 kcal/mol
		NCBI Blast	Baja Selectividad, Clostridium, E.coli
(Valerio <i>et al.</i> , 2010)	F 5'GACTTATAGCCATCTCATCT' R5'TTGACGCTCTGTTTGTA'	Horquilla F	0.71 kcal/mol
		Autodímeros F	-3.4 kcal/mol
		Heterodímeros	-4.74 kcal/mol
		Horquilla R	0.37 kcal/mol
		Autodímeros R	-3.61 kcal/mol
		NCBI Blast	Selectividad baja, muchos microorganismos presentes en el agua natural
(Valerio <i>et al.</i> , 2010)	F 5'ATCACTTCAATCTAACGACT' R5'AGTTGCTGCTGTAAGAAA'	Horquilla F	1.13 kcal/mol
		Autodímeros F	-3.61 kcal/mol
		Heterodímeros	-3.9 kcal/mol
		Horquilla R	-0.23 kcal/mol
		Autodímeros R	-3.14 kcal/mol
		NCBI Blast	Selectividad baja, muchos microorganismos presentes en el agua natural
(Valerio <i>et al.</i> , 2010)	F 5'CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA' R5'GCAATTAAGCGATTCCCTCC'	Horquilla F	-4.7 kcal/mol
		Autodímeros F	-13.5 kcal/mol
		Heterodímeros	-6.75 kcal/mol
		Horquilla R	0.86 kcal/mol
		Autodímeros R	-5.36 kcal/mol
		NCBI Blast	Más o menos selectivo, se puede unir al genoma de otras bacterias. (Pero la mayor selectividad si es a cianobacterias)
(Fortin <i>et al.</i> , 2010)	F 5'TGGGGATGGACTCTCTCACTTC' R5'GGCTTCAACATTCCGAAAACG'	Horquilla F	0.34 kcal/mol
		Autodímeros F	-1.95 kcal/mol
		Heterodímeros	-3.52 kcal/mol
		Horquilla R	-0.66 kcal/mol
		Autodímeros R	-3.61 kcal/mol
		NCBI Blast	Microcystis, Anabaena y Thermocrinis albus
(Fortin <i>et al.</i> , 2010)	F 5'TACGGGAGTAACTTTCGGCTCA' R5'ACAAGCATCTAACATAGCGGGA'	Horquilla F	-1.15 kcal/mol
		Autodímeros F	-3.61 kcal/mol
		Heterodímeros	-4.74 kcal/mol
		Horquilla R	0.32 kcal/mol
		Autodímeros R	-3.61 kcal/mol
		NCBI Blast	Microcystis (MeyD), Paenibacillus sp, Wolbachia sp

(Sipari <i>et al.</i> , 2010)	Microcystis F5'AAGCAAAGTCTCCCGGTATC' R5'CAATGGGAGCATAACGAGTCAA'	Horquilla F	-1.61 kcal/mol
		Autodímeros F	-9.75 kcal/mol
		Heterodímeros	-14.41 kcal/mol
		Horquilla R	-0.5 kcal/mol
		Autodímeros R	-3.61 kcal/mol
		NCBI Blast	Mucha Especificidad, mcyE
(Sipari <i>et al.</i> , 2010)	Anabaena F5'CTAGAGTAGTCACTCACGTC' R5'GGTTCTTGATAGTTAGATTGAGC'	Horquilla F	-2.33 kcal/mol
		Autodímeros F	-6.3 kcal/mol
		Heterodímeros	-5.13 kcal/mol
		Horquilla R	0.89 kcal/mol
		Autodímeros R	-3.17 kcal/mol
		NCBI Blast	Anabaena (mcyE), Aliivibrio salmonicida (Agua marina), Liberibacter crescens (Fitopatógeno), Streptococcus suis (Enfermedad en marranos)
(Qiu <i>et al.</i> , 2013)	F 5'AAGCAAAGTCTCCCGGTATC' R5'CAATGGGAGCATAACGAGTCAA'	Horquilla F	-1.61 kcal/mol
		Autodímeros F	-6.69 kcal/mol
		Heterodímeros	-14.41 kcal/mol
		Horquilla R	-0.5 kcal/mol
		Autodímeros R	-3.61 kcal/mol
		NCBI Blast	Buena Especificidad, Microcystis mcyE
(Qiu <i>et al.</i> , 2013)	F 5'CGGACGGGTGAGTAACGCGTG' R5'CCCATTCGGGAAAATTCCCC'	Horquilla F	-4.7 kcal/mol
		Autodímeros F	-13.05 kcal/mol
		Heterodímeros	-6.75 kcal/mol
		Horquilla R	-1.23 kcal/mol
		Autodímeros R	-6.59 kcal/mol
		NCBI Blast	Baja especificidad
(Qiu <i>et al.</i> , 2013)	F 5'AACCCGAAATGACTCAAGAAAAA R 5'TCAAAAATACCGATAGGATGTT'	Horquilla F	0.79 kcal/mol
		Autodímeros F	-3.61 kcal/mol
		Heterodímeros	-3.61 kcal/mol
		Horquilla R	-2.85 kcal/mol
		Autodímeros R	-3.61 kcal/mol
		NCBI Blast	Microcystis (mcyE), alteromonas, proteus, vibrio, etc... poca especificidad
(Hurtado <i>et al.</i> , 2014)	F 5'AAAATTTAAAAGCCGTATCAAA' R5'AAAAGTGTATTATTAGCGGCTCAT'	Horquilla F	2.51
		Autodímeros F	-5.36
		Heterodímeros	-38.66
		Horquilla R	0.05
		Autodímeros R	-5.83
		NCBI Blast	Gen blanco mcyA, Baja especificidad: se une a otras cianobacterias, microorganismos acuáticos y genes de mamíferos
(Hurtado <i>et al.</i> , 2014)	F 5'-GAAATTTGTGTAGAAGGTGC-3' R 5'- CAATGGGAGCATAACGAG -3'	Horquilla F	1.71
		Autodímeros F	-9.25
		Heterodímeros	-5.09
		Horquilla R	-0.5
		Autodímeros R	3.61
		NCBI Blast	Gen blanco mcyE, alta especificidad el Forward, baja del Reverse. Se podrían unir a otros microorganismos, entre ellos cianobacterias.
(Hurtado <i>et al.</i> , 2014)	F 5'-GAAATTTGTGTAGAAGGTGC-3' R 5'-CAATCTCGGTATAGCGGC-3'	Horquilla F	1.71
		Autodímeros F	-9.25
		Heterodímeros	-3.9
		Horquilla R	-0.45
		Autodímeros R	-3.61
		NCBI Blast	Gen blanco mcyE, alta especificidad el Forward, baja del Reverse. Se podrían unir a otros microorganismos, entre ellos cianobacterias.

ADN en muestras de agua del embalse Riogrande II

Después de la extracción de ADN de los microorganismos presentes en el embalse Riogrande II, se verificó el éxito de este proceso en todas las muestras y posteriormente se efectuó el análisis del potencial tóxico. Como se evidencia en la figura 18, las bandas de ADN evidencian extracción exitosa de esta molécula desde el material colectado en la totalidad las muestras. Mientras las bandas de las estaciones 1, 2 y 3 (E1, E2 y E3 respectivamente) indica la presencia de ADN no degradado en las muestras, en los controles (1C, 2C, 4C y Porce (+)) la mayor migración del ADN muestra un material genético más fragmentado. En consecuencia, la cantidad de ADN extraído se consideró apropiada para evaluar el potencial tóxico de las cianobacterias en el embalse. El control positivo (Porce (+))se obtuvo mediante un arrastre en el embalse Porce II, en una estación donde se había verificado previamente la presencia de cianobacterias potencialmente tóxicas.

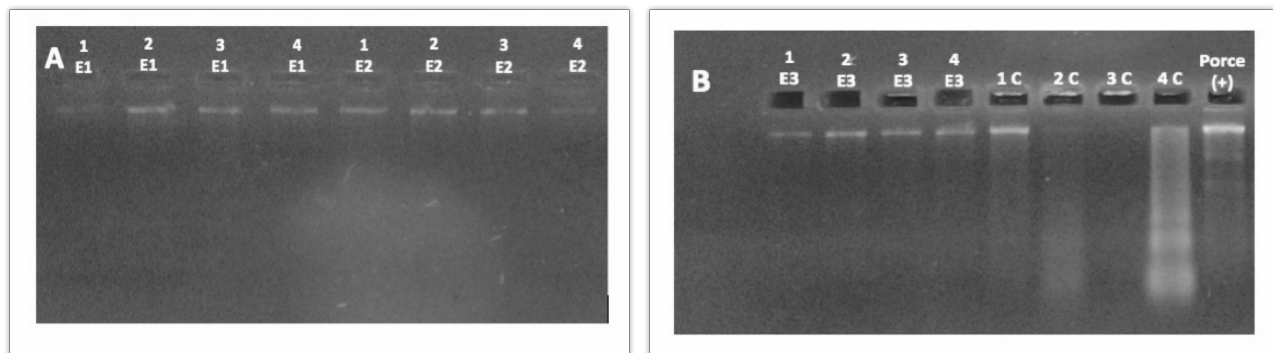


Figura 18 Bandas de ADN en muestras procedentes de las estaciones. A.) Estación 1 (E1) y Estación 2 (E2) durante cuatro muestreos (1, 2, 3 y 4). B.) Estación 3 (E3), Controles (1C, 2C, 3C, 4C) durante cuatro muestreos (1, 2, 3 y 4) y control positivo para la presencia de cianobacterias (Porce(+)).

Estandarización de la Temperatura de Fusión (T_m) de los primers

Los primers utilizados para la amplificación de la región del ADN perteneciente al gen de cianotoxinas *mcy* se describieron en la **Tabla 4**. Cada primer se estandarizó con diferentes Temperaturas de Fusión (T_m), como se indica en la **Tabla 11**.

Tabla 11 Estandarización de la Tm (°C) para los primers 3, 4, 5, 6 y 7.

Primer Código	PRIMERS	Tm (°C) PROMEDIO de la Hoja de especificaciones del primer	Tm (°C) (Recomendación del Kit Taq polimerasa)	Tm (°C) De la literatura	Tm (°C) PrimerBlast	Otras Tm (°C) Evaluadas
3	F: 5'-TGGGGATGGACTCTCTCACTTC -3', R: 5'-GGCTTCAACATTCGGAAAACG-3'.	56.5	54	58 (Fortin <i>et al.</i> , 2010)	(F) 60.89 (R) 58.68	-
4	F: 5'-TACGGGAGTAACTTTCGGCTCA-3', R: 5'-ACAAGCATCTAACATAGCGGGA-3'	57	55	58 (Fortin <i>et al.</i> , 2010)	(F) 61.14 (R) 59.57	-
5	F: 5'-CTAGAGTAGTCACTCACGTC-3', R: 5'-GGTTCTTGATAGTTAGATTGAGC-3'.	51	53	62 (Sipari <i>et al.</i> , 2010)	(F) 54.15 (R) 54.89	55, 57, 59, 61
6	F: 5'-TTTGATGGCATTTTAGCCCGC -3', R: 5'-GGCTCTGCACAGGTTCTACT -3'.	56	54	-	(F) 60.13 (R) 59.39	53, 55, 57
7	F:5'-CAGCAACAAATGCAACACGGA -3', R: 5'-AGCGACTCGTTCTACACCTG-3'.	56.7	54	-	(F) 60.54 (R) 59.48	51, 52, 53, 55, 57

En la Tabla 12 se presentan los resultados de amplificación a diferentes temperaturas para cada uno de los primers con muestras colectadas en un arrastre del embalse Porce II, que contenía *Microcystis* sp y *Dolichospermum* sp. Los primers 3 y 4 amplificaron en forma óptima a 58 y 56 °C, respectivamente. En contraste a temperaturas inferiores y superiores a estos valores no se obtuvo una amplificación adecuada. Las temperaturas de fusión de los primer 5, 6 y 7 que verificaban el potencial tóxico de las cianobacterias del Orden Nostocales no se lograron estandarizar. Esto indica que probablemente las cianobacterias Nostocales colectadas durante el periodo de estudio no disponían de gen de toxicidad de microcistina.

Tabla 12 Temperaturas de Fusión (°C) que permitieron una amplificación adecuada de los primers 3, 4, 5, 6 y 7.

Primer Código	PRIMERS	Tm (°C)	Tamaño del producto de amplificación (pb)
3	F: 5'-TGGGGATGGACTCTCTCACTTC -3', R: 5'-GGCTTCAACATTCGGAAAACG-3'.	58	107
4	F: 5'-TACGGGAGTAACTTTCGGCTCA-3', R: 5'-ACAAGCATCTAACATAGCGGGA-3'	56	129
5	F: 5'-CTAGAGTAGTCACTCACGTC-3', R: 5'-GGTTCTTGATAGTTAGATTGAGC-3'.	-	127
6	F: 5'-TTTGATGGCATTTTAGCCCGC -3', R: 5'-GGCTCTGCACAGGTTCTACT -3'.	-	184
7	F:5'-CAGCAACAAATGCAACACGGA -3', R: 5'-AGCGACTCGTTCTACACCTG-3'.	-	102

Selectividad de los primers

En la prueba de sensibilidad para corroborar que los primers son selectivos para el gen *mcy* se utilizó una mezcla de ADN de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 , *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Como se evidencia en la Figura 19 los primers 3 y 4 son específicos para cianobacterias y no se observa amplificación con ADN de bacterias heterótrofas.

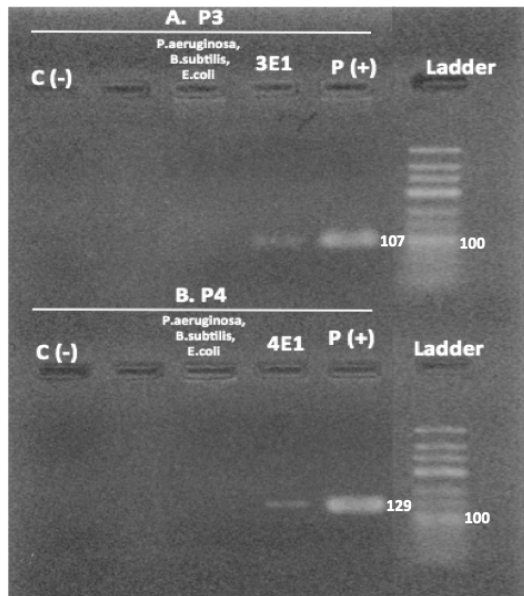


Figura 19 Amplificación de (A) Primer 3: Control Negativo (C(-)), Bacterias heterótrofas (*P.aeruginosa*, *B.subtilis*, *E.coli*), Estación 3 del embalse durante el tercer muestreo (3E1) y Control Positivo (P(+)). (B) Primer 4: Controles Negativo (C(-)), Bacterias heterótrofas (*P.aeruginosa*, *B.subtilis*, *E.coli*), Estación 1 del embalse durante el cuarto muestreo (4E1) y Control Positivo (P(+)).

Prueba de inhibidores

Con el fin de descartar la presencia de inhibidores en las muestras de agua colectadas en el embalse entre diciembre 2014 y mayo 2015 y evitar falsos negativos, se realizaron ensayos de inhibición con mezclas de muestras procedentes del embalse Porce II (control positivo, Porce (+)) y del Riogrande II. Como se observa en la Figura 20 no se registró una disminución en la amplificación de los primers 3 y 4 en los tratamientos con la mezcla del control positivo y de la muestra del embalse Riogrande II (M1, M2, M3). De esta forma, se descartó la presencia de inhibidores en las muestras de agua del embalse Riogrande II y en consecuencia fue posible evaluar el potencial tóxico de microcistinas.

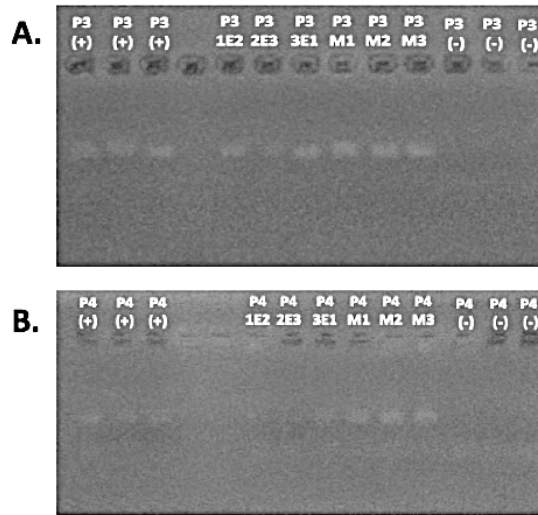


Figura 20 Prueba de Inhibición. (A) Amplificación del primers 3 (P3) en controles positivos (+), muestras de Riogrande II (1E2, 2E3 y 3E1), mezcla entre muestras del embalse y el control positivo (M1, M2, M3) y controles negativos (-). (B) Amplificación del primers 4 (P4) en controles positivos (+), muestras de Riogrande II (1E2, 2E3 y 3E1) y mezcla entre muestras del embalse y el control positivo (M1, M2, M3) Y controles negativos (-).

Caracterización molecular de cianobacterias en muestras de agua del embalse Riogrande II

Como se evidencia en las **Figuras 21 y 22** y en la Tabla 13, en todas las muestras de agua colectadas en las tres estaciones del embalse Riogrande II, entre diciembre 2014 y mayo 2015 se encontraron cianobacterias Nostocales y Chroococcales (Primer 3) y el gen *mcyD* del Orden Chroococcales (Primer 4), independientemente de la densidad de las cianobacterias

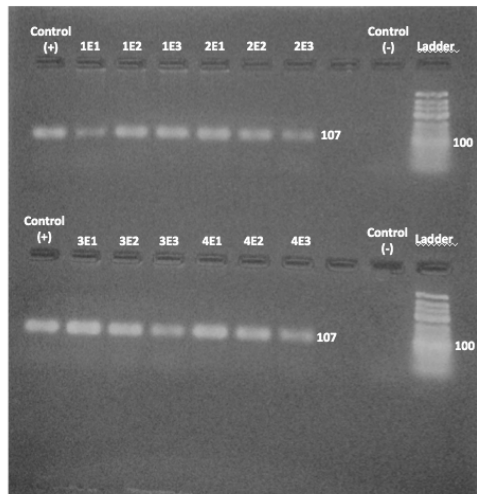


Figura 21 Amplificación del primer 3 en las muestras del embalse Riogrande II. Estación 1 (E1), Estación 2 (E2) y Estación 3 (E3) durante cuatro muestreos (1, 2, 3 y 4). Control positivo (Control +) y Control Negativo (Control -)

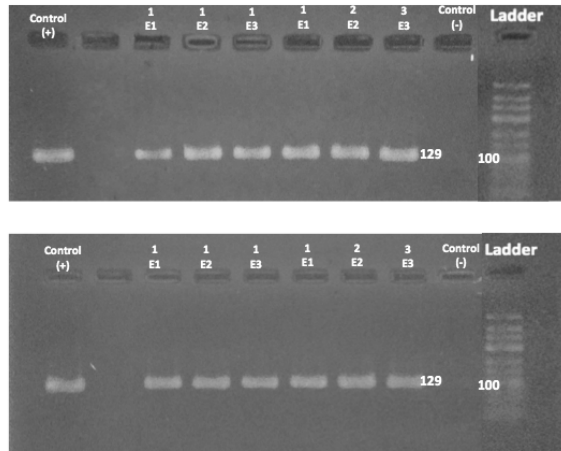


Figura 22 Amplificación del primer 4 en las muestras del embalse Riogrande II. Estación 1 (E1), Estación 2 (E2) y Estación 3 (E3) durante cuatro muestreos (1, 2, 3 y 4). Control positivo (Control +) y Control Negativo (Control -)

Tabla 13 Amplificación de los primers 3 y 4 en las muestras de agua del embalse

MUESTREO	ESTACIÓN	Primer 3	Primer 4
		PRESENCIA DE NOSTOCALES Y CHROOCOCCALES	PRESENCIA DEL GEN <i>myD</i> EN CHROOCOCCALES
DICIEMBRE	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
MARZO	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
ABRIL	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
MAYO	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+

Debido a que las temperaturas de fusión de los primer 5, 6 y 7 para verificar el potencial tóxico de las cianobacterias del Orden Nostocales no se lograron estandarizar con el control positivo procedente del embalse Porce II, se diseñaron tres oligos que serán empleados para verificar el funcionamiento de los primers y el potencial tóxico de las Nostocales (Tabla 14).

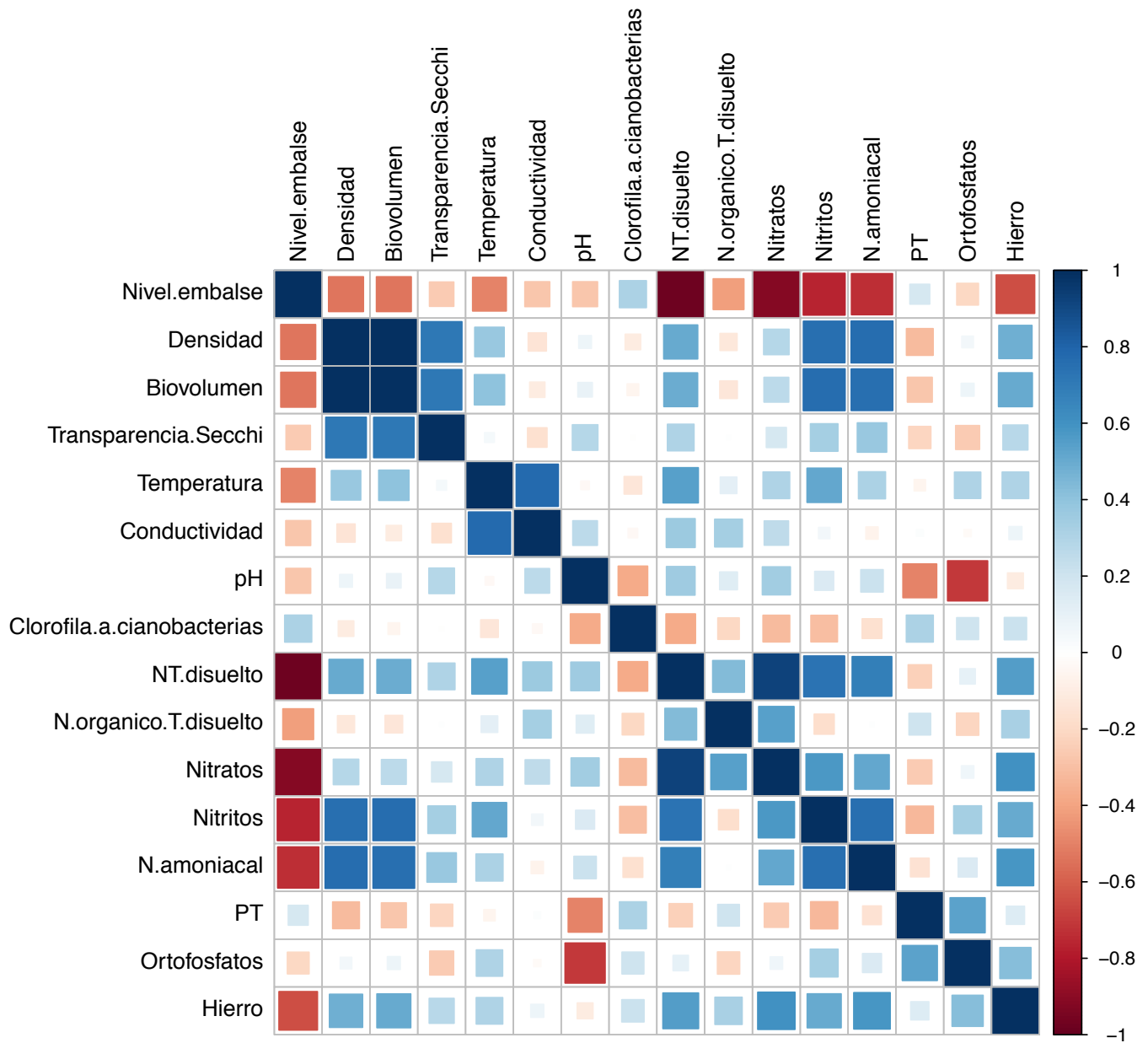
Tabla 14 Oligos diseñados para corroborar el buen funcionamiento de los primers 5, 6 y 7 que amplifican el gen *mcy* de cianobacterias Nostocales

Primer	Oligo diseñado
5	<u>CTAGAGTAGTCACTCACGTC</u> CATAAAGAATTAATGTATTAGTTAAATTAGCTGATTTCTTCAAAGTTCCCAACAATTGTTGGATTAGCAGCTTTAATATCTAAAG <u>GCTCAATCTAACTATCAAGAACC</u>
6	<u>TTTGATGGCATT</u> TTTAGCCCGCGCTGGCGAGGAAGTAGGAACAGCTGAACCATTGAGTCTTGGTACACCATCAGAAATGGTTGAAGATGTTATAGTTCTTACCTATGGAGCGGAAGAAAGTCTAGAAATAATTGCAGAGCAAGCTGATAATTTAGCAGCAGTTT <u>TAGTAGAACCTGTGCAGAGCC</u>
7	<u>CAGCAACAAATGCAACACGGA</u> ATTGGTTTAGGAATGCAGTCTAATATTGCAGCAGAAACAGCTGCTTTAATTTGTGAAATGA <u>CAGGTGTAGAACGAGTCGCT</u>

9.5 Análisis Estadísticos

En la Tabla 15 se presentan las variables con correlaciones positivas y significativas según las correlaciones de los datos fisicoquímicos y biológicos de Spearman. Los resultados completos se encuentran en el Anexo 3. Únicamente el nitrógeno total disuelto, nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal y el hierro mostraron una correlación significativa con el **nivel del embalse**. Es importante resaltar que mientras la **clorofila a** del grupo espectral azul no se correlaciono con alguna de las variables físicas y químicas, **la densidad y el biovolumen** mostraron una correlación significativa con el nitrógeno total disuelto, nitritos, el nitrógeno amoniacal y la transparencia Secchi.

Tabla 15 Correlación de Spearman de los datos fisicoquímicos obtenidos durante los muestros de diciembre 2014 a mayo 2015. Los cuadrados grandes y de color azul oscuro y rojo representan correlaciones significativamente positivas y negativas, respectivamente.



10. DISCUSIÓN

Los valores medios de temperatura del agua en la zona fótica (aproximadamente 17°C) y la ubicación altitudinal del embalse (2270 msnm), permiten clasificarlo como un embalse cálido de alta montaña de la zona tropical según Márquez y Guillot (2001). De acuerdo con los resultados de transparencia Secchi (rango), el embalse Riogrande II es un sistema turbio (Loaiza *et al.*, 2011) con una zona fótica de menor profundidad que la zona de mezcla. .

En general, en el embalse Riogrande II se observó una correlación estadísticamente significativa entre la densidad de células y el biovolumen de cianobacterias con los nutrientes, exceptuando las formas de fósforo. Palacio (2014) no encontró una buena correlación de los nutrientes con la biomasa de cianobacterias Nostocales y estos se asociaron al aumento de la biomasa de *Microcystis*. Mientras el nitrógeno es esencial para cianobacterias del Orden Chroococcales, no constituye generalmente un nutriente limitante para el Orden Nostocales, debido a la capacidad de algunos géneros de fijar nitrógeno atmosférico a partir de células modificadas llamadas heterocitos (Bonilla, 2009).

Niveles de nitratos en el agua no superiores a 0.62 mg/L y de nitritos inferiores a 0.04mg/L estarían indicando una condición oligotrófica en las tres estaciones durante todo el periodo de estudio según los criterios de Vollenweider (1968) donde se asigna esta clasificación trófica con nitratos entre 0,0 a 1 mg/L y según los nitritos entre 0,0 y 0,5 mg/L. (ver Tabla 7). Los resultados anteriores, indican que en el embalse Riogrande II las formas solubles de nutrientes y especialmente de nitrógeno, son asimiladas rápidamente por la biota y por tanto, sus bajas concentraciones en el agua no son indicadoras del estado trófico del sistema.

Es importante tener en cuenta que se ha encontrado que en ambientes pobres en nitrógeno los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia* y *Cylindrospermopsis* presentan altos niveles de microcistinas, anatoxina-a y nodularina, respectivamente (Rapala *et al.*, 1993; Rapala *et al.*, 1997; Lehtimaeki *et al.*, 1997; Saker *et al.*, 1999). Por su parte, cepas de *Oscillatoria* y *Microcystis*, no fijadoras de nitrógeno, presentan altos niveles de cianotoxinas en presencia de altas concentraciones de nitrógeno (Sivonen & Jones, 1999). Durante este estudio, la densidad y biovolumen de cianobacterias del Orden Chroococcales y Nostocales se correlacionaron con el nitrógeno total disuelto, nitrógeno orgánico disuelto, nitratos y amonio (ver Tabla 15), importantes para el crecimiento y probablemente para la producción de toxinas.

Según la clasificación para lagos templados de Vollenweider (1968), a partir de la concentración de fósforo total con valores entre 20 y 80 µg/L (Tabla 7) el embalse Riogrande II presentó condiciones desde mesotróficas (10-35 µg/L) hasta eutróficas (35-100 µg/L). Durante este estudio, la concentración de ortofosfatos en la zona fótica fluctuó entre 0.01 y 0.03 mg P-PO₄³⁻ en las tres estaciones (Tabla 7), valores inferiores a los reportados por Palacio (2014) pero superiores a los propuestos por Roldán y Ramírez (2008) para lagos tropicales (0,001 y 0,002 mg/L)

En numerosos ambientes acuáticos, el fósforo es el nutriente limitante y favorece su eutrofización. Este elemento puede ser almacenado intracelularmente por cianobacterias del orden Nostocales y Chroococcales como gránulos de

polifosfato. (Arocena *et al.*, 2008) En pruebas de laboratorio se ha reportado la disminución de la producción de microcistina en *Anabaena*, *Microcystis* y *Oscillatoria*, anatoxina-a en *Aphanizomenon* y nodularina en *Nodularia* a bajas concentraciones de fósforo (Sivonen & Jones, 1999; Nellan *et al.*, 2013).

Dado que la temperatura y la radiación solar no varían significativamente en el embalse durante el ciclo anual (Gómez *et al.*, 2013), los factores determinantes de la dinámica de las cianobacterias son principalmente los caudales de las corrientes aportantes, el nivel del embalse, la localización de la pluma del Río Grande y de nutrientes desde las cuencas (Palacio, 2014). No obstante, se asume que las temperaturas debe ejercer un efecto sobre el crecimiento de cianobacterias y la producción de toxinas.

Los géneros de cianobacterias con mayor frecuencia durante las cuatro campañas de muestro fueron *Sphaerospermopsis* y *Aphanocapsa* durante los meses de mayo y abril 2015. Los géneros *Dolichospermum sp.1* en diciembre 2014, abril y mayo 2015 y *Microcystis wesenbergii* en mayo mostraron las mayores densidades y biovolúmenes. En consecuencia, se observa un predominio de las cianobacterias Nostocales y alternancia de dominancia con *Microcystis wesenbergii*. De acuerdo con el modelo conceptual presentado por Palacio (2014) cuando el nivel del embalse fue bajo dominaron las formas coloniales, especialmente del género *Microcystis*. Con el aumento del nivel, después del período seco, se incrementó la biomasa total y dominó el género *Dolichospermum* (Nostocales). Un nivel del embalse superior al 90%, durante un periodo prolongado, favoreció a las formas coloniales del orden Chroococcales, pero con bajas biomasa. Finalmente, un descenso de nivel del embalse, estimuló el crecimiento de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Nostocales).

Durante el presente estudio, únicamente en diciembre de 2014 se presentó un nivel alto del embalse y en los tres muestreos restantes predominaron condiciones de aguas bajas e intermedias. En general, la biomasa de cianobacterias fue considerablemente inferior a la reportada por Palacio (2014) con biovolúmenes entre 0.081 y 6.49 mm³/L. Aunque durante el periodo de aguas bajas se registró un incremento en la biomasa con relación al muestreo de diciembre 2014 (Figuras 23, 24 y 25), no se encontró un predominio de *Microcystis*. Se evidenció un gran predominio de las clorofíceas sobre las cianofíceas y en términos generales, el aporte del grupo espectral azul a la clorofila a total fue bajo, exceptuando en el brazo del río Chico en abril 2015. Mientras que *Microcystis wessenberguii* (orden Chroococcales) alcanzó el mayor biovolumen en mayo 2015, *Dolichospermum sp.1* (orden Nostocales) presentó los biovolúmenes más elevados en diciembre 2014, abril y mayo 2015. Es decir, no se presentó la tendencia descrita por Palcio (2014) en relación con el crecimiento de Nostocales en aguas bajas, debido posiblemente a las bajas densidades registradas en el presente estudio.

Estos resultados indican que, aunque el embalse presentó condiciones eutróficas que teóricamente deberían favorecer el predominio de las cianobacterias sobre los demás grupos del fitoplancton, las algas verdes y en algunos casos, las

criptofitas dominaron ampliamente la biomasa. De acuerdo con López-Muñoz (2015), en el embalse domina el alga verde *Staurastrum paradoxum* en aguas bajas y *Staurastrum spp* en aguas altas (López-Muñoz, 2015)

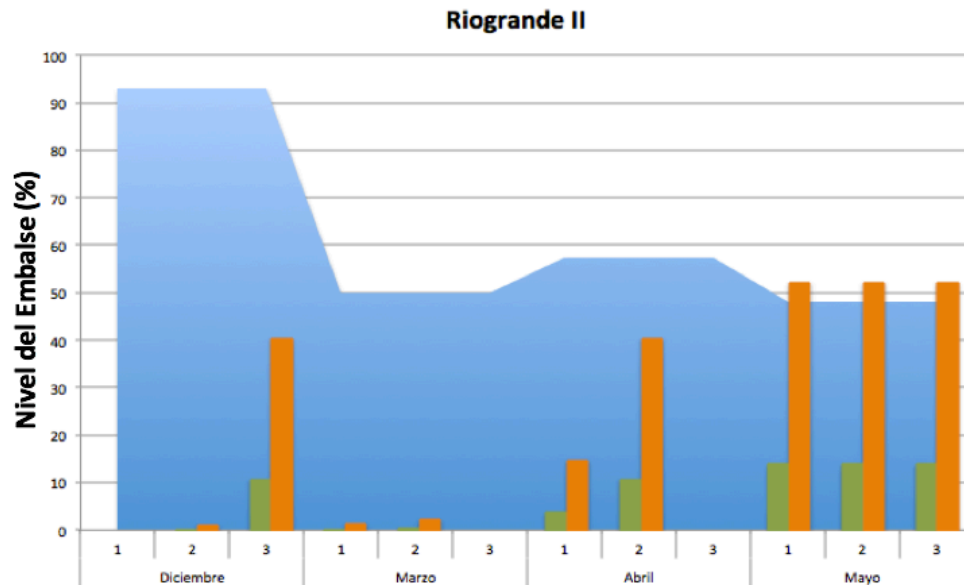


Figura 23 Nivel del embalse (■), densidad (■) y biovolumen (■) de Nostocales en tres estaciones en el embalse Riogrande II entre diciembre de 2014 y mayo de 2015.

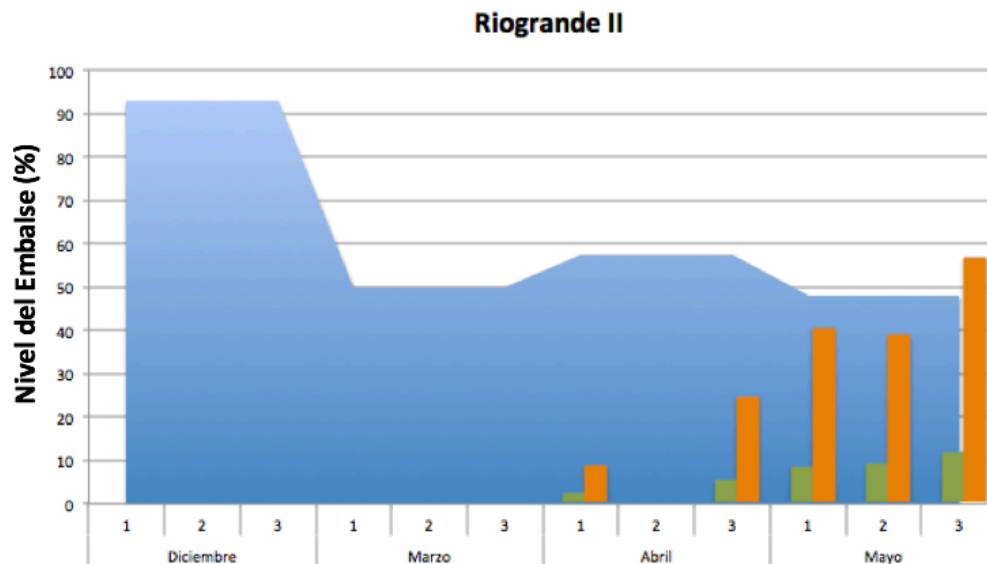


Figura 24 Nivel del embalse (■), densidad (■) y biovolumen (■) de Chroococcales en tres estaciones en el embalse Riogrande II entre diciembre de 2014 y mayo de 2015.

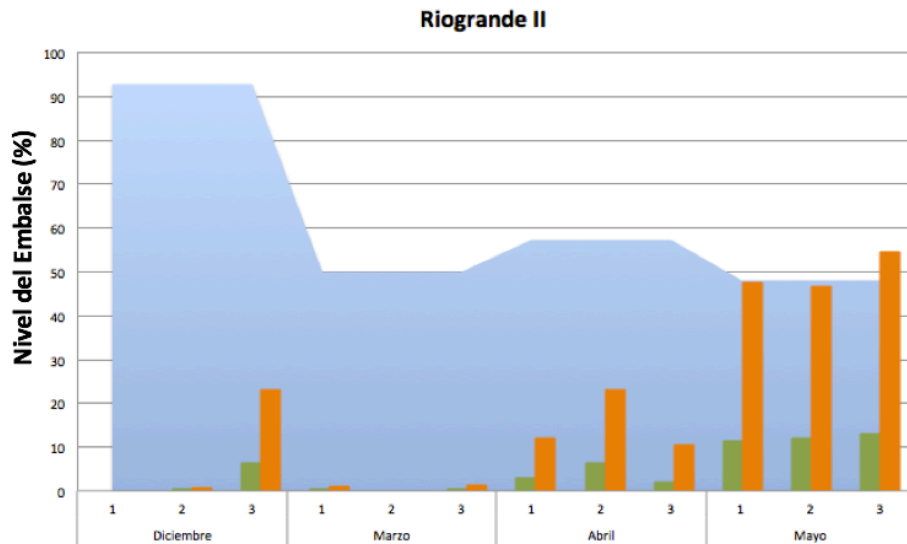


Figura 25 Nivel del embalse (■), densidad (■) y biovolumen (■) de cianobacterias Nostocales y Chroococcales en tres estaciones del embalse Riogrande entre diciembre de 2014 y mayo de 2015.

Mientras Palacio *et al.*, (2015) identificaron en el embalse Riogrande II 11 taxa de cianobacterias de los órdenes a Chroococcales y Nostocales, en el presente estudio se encontraron 3 taxa del orden Chroococcales y 2 del orden Nostocales (ver Tabla 8). La totalidad de los taxos determinados en el presente estudio fueron reportados previamente por Palacio (2014) y son potenciales productores de cianotoxinas.

Los géneros de cianobacterias con mayor frecuencia durante los cuatro muestreos fueron *Sphaerospermopsis* y *Aphanocapsa* en mayo y abril 2015. Los géneros *Dolichospermum sp.1* en diciembre 2014, abril y mayo 2015 y *Microcystis wesenbergii* en mayo mostraron las mayores densidades y biovolúmenes (ver Tabla 8, Figura 8 y Figura 9). Es importante resaltar que la densidad y el biovolumen de *Aphanocapsa sp.* no pudieron ser determinadas debido a la dificultad del recuento de cada una de las células, y en consecuencia, no se puede concluir sobre su comportamiento durante el estudio.

Es importante resaltar que para embalses destinados al tratamiento de aguas de consumo y/o recreación se han propuesto valores límites superiores o cercanos a $10\mu\text{g/L}$ de clorofila a del grupo espectral azul o aproximadamente 20.000 células/ml (Oliver & Ganf, 2002) Aunque durante el presente estudio la densidad de cianobacterias no superará las 15,416 células /ml (ver Tabla 8), en la estación 1 los valores de clorofila del grupo espectral azul fueron superiores a $10\mu\text{g/L}$ en los muestreos de abril y mayo del 2015.

Si se consideran los criterios de Salas y Martino (1990) para la clasificación del estado trófico de ambientes tropicales, durante el periodo de estudio en todas las estaciones del embalse se registraron condiciones de eutrofia con valores

superiores a 17.39 $\mu\text{g/L}$ e incluso hipereutrofia con concentraciones de clorofila cercanos a 60 $\mu\text{g/L}$ en la zona fótica de las estaciones 1 y 2 en el periodo de aguas bajas o niveles intermedios entre marzo y mayo 2015 (ver Anexo 4: Datos Fluorómetro).

Dado que durante una floración de cianobacterias pueden coexistir cepas de una misma especie potencialmente tóxicas y no tóxicas (Roset *et al.*, 2001) que no pueden ser diferenciadas a partir de su morfología (Dziallas *et al.*, 2011), es importante aplicar herramientas que permitan determinar la presencia de cepas dotadas con el gen de toxicidad y determinar los factores que favorecen su crecimiento y la producción de toxinas. Entre estas técnicas la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido aplicada en numerosos países (Rantala, 2007, Metcalf *et al.*, 2009, Valerio *et al.*, 2010, Abed *et al.*, 2013). Los resultados del presente estudio con cepas portadoras del gen *mcy* durante todas los muestreos y todas las estaciones indican claramente que este procedimiento es adecuado para determinar la presencia de cepas potencialmente tóxicas (Tabla 13) .

La presencia del gen de toxicidad en cepas de cianobacterias Chroococcales en todas las estaciones de muestreo (ver Figura 21, Figura 22 y Tabla 13) y durante todo el estudio ratifica los resultados de Herrera *et al.*, (2015), quien reportó microcistinas en extractos de cianobacterias procedentes del embalse en concentraciones superiores al máximo permisible (1 $\mu\text{g/L}$) establecido por la OMS (1998) durante un florecimiento dominado por Chroococcales en el 2012.

De acuerdo con el modelo conceptual presentado por Palacio (2014), cuando el nivel del embalse fue bajo dominaron las formas coloniales, especialmente del género *Microcystis* (ver Figura 24) . En estas circunstancias se podría afirmar que el periodo de aguas bajas en el embalse es crítico desde el punto de vista del potencial de producción de microcistinas porque predominan las cianobacterias Chroococcales.

El Hierro es un elemento importante en la síntesis de cianotoxinas, bajas concentraciones de este metal en el agua se han relacionado con el aumento de la producción de estas y el crecimiento celular de cianobacterias. (Nellan *et al.*, 2013, Utkilen & Gjølme, 1995, Lukac & Aegerter, 1993) Adicionalmente, Kaebernick & Neilan (2001) indicaron que no solo las bajas concentraciones de hierro sino también la alta intensidad lumínica están implicados en la transcripción de los genes *mcy* y que el hierro actúa como un quelante durante la fotosíntesis. Martín *et al.* (2002) resaltan la regulación de la expresión de la microcistina a través de la enzima FUR, que es activada por el Hierro. En consecuencia, bajas concentraciones de hierro favorecen la expresión de cianotoxinas debido a la inhibición de la enzima reguladora (FUR) de la expresión del operón *mcy*. Aunque en el embalse la concentración de hierro en el agua se incrementó de 0.1 hasta 0.43 mg/L en la estación 1, 0.3 hasta 0.31 mg/L en la estación 2 y 0.21 hasta 0.58 mg/L en la estación 3 durante la disminución del nivel del embalse (nivel de significancia -0.726) (Figura 26), estos valores no pueden ser considerados altos y podrían estar indicando un riesgo importante de producción de toxinas por parte de las cianobacterias en el embalse, debido a la baja actividad de la enzima reguladora FUR. De acuerdo con Botana *et al.*,

(2015), en condiciones de laboratorio la concentración óptima de hierro para la producción de cianotoxinas en *Microcystis aeruginosa* es <0.5 mg/L.

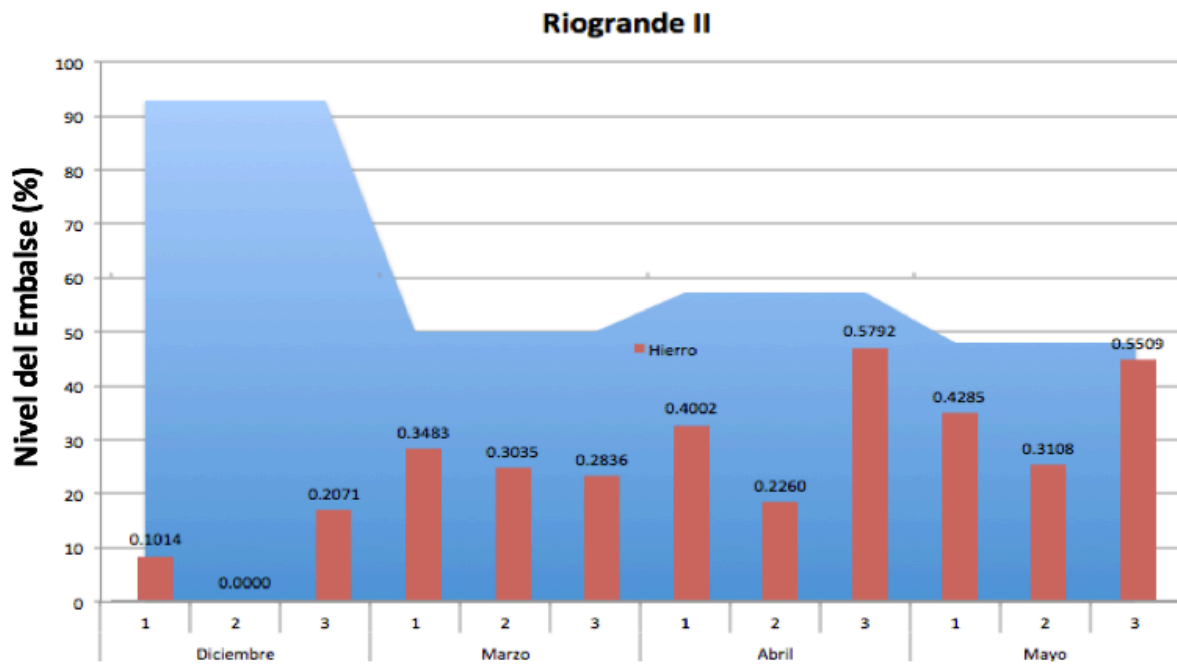


Figura 26 Nivel del embalse y concentración de hierro en Riogrande II.

RECOMENDACIONES

La PCR es una metodología económica, fácil de aplicar y es confiable para evaluar la presencia de cepas portadoras del gen de toxicidad *mcy*. En consecuencia se puede evaluar rápidamente el potencial tóxico de las cianobacterias en un determinado ecosistema.

10. CONCLUSIONES

- Durante el estudio, la concentración de clorofila a total superó el valor de referencia (17.39 $\mu\text{g/L}$) propuesto por Salas y Martino (1990) para ambientes eutróficos. En el periodo de aguas bajas e intermedias entre marzo y mayo 2015 los valores de clorofila a total cercanos a 60 $\mu\text{g/L}$ en la zona fótica indicaron una condición hipereutrófica en las estaciones 1 y 2.
- Aunque durante el periodo de estudio el aporte del grupo espectral azul a la clorofila a total fue relativamente bajo, exceptuando en el brazo del río Chico en abril 2015, en la totalidad de las estaciones y en todos los muestreos se detectó la presencia de cepas portadoras del gen *mcy*.
- La presencia del gen *mcy* indica claramente que en el embalse Riogrande II los florecimientos de cianobacterias del orden Chroococcales podrían representar un riesgo importante desde el punto de vista ambiental y para la salud de los consumidores del recurso agua. Mientras que los florecimiento de cianobacterias del orden Nostocales no representan un riesgo de toxicidad ya que durante los años 2012 y 2013 no se encontró el gen *mcy* en estas cepas.
- Además de la presencia de cepas portadoras del gen toxicidad para microcistina en todas las estaciones y todos los muestreos, las bajas concentraciones de hierro en el agua podrían estar indicando que el operón *mcy* no está regulado por la enzima FUR que inhibe la producción de microcistina a altas concentraciones de hierro y en consecuencia se podría esperar entonces que las cepas portadoras de este gen tienen mayor probabilidad de producir microcistina.
- De acuerdo a la transparencia Secchi y a la temperatura el embalse Riogrande II es un sistema turbio y cálido de alta montaña de la zona tropical.
- A partir del modelo conceptual propuesto por Palacio (2014) un nivel del embalse Riogrande II bajo favorece el crecimiento de cianobacterias del orden Chroococcales, especialmente del género *Microcystis*. En consecuencia, durante este periodo se registra un incremento en el riesgo de producción de microcistinas en el embalse.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abed, I. M. Jawad, A., Abdulhasan, G.A., Al- Hussieny, A.A., Kamel, R.F., Moushib, L.I.** 2013. PCR Detection of MycrocystinSynthetase E Gene in Toxogenic Cyanobacteria Isolated from Tigris River in Baghdad City. International Journal of Advanced Research, Volume 1, Issue8, 256-260
- Andrinolo, D., Echenique, R., Sedan, D.** 2009. Toma de muestra de agua en diferentes ambientes para determinaciones de algas y toxinas. Procedimientos analíticos. Métodos de detección de cianotoxinas. En: Giannuzzi, L. (ed), Cianobacterias y Cianotoxinas Identificación, Toxicología, Monitoreo y Evaluación de Riesgo. Buenos Aires: 117–150
- Amann R, Fuchs B.M.** 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. Nature reviews. Microbiology, 6(5), pp.339-48
- APHA-AWWA-WPCF.** American Public Health Association-American Water Works, Association-Water Pollution, Control Federation. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th ed.
- Arocena, R., Chalar, G., Fabián, D., De León, L., Brugnoli, E., Silva, M., Rodó, E., Machado, I., Pacheco, J.P., Castiglioni, R., Gabito, L.** 2008. Informe final del Convenio DINAMA-Fac. Ciencias (Sec. Limnología) Evaluación Ecológica de Cursos de Agua y Biomonitorio.
- Aubriot, L., Bonilla, S., Kruk, C.** 2009. Cianobacterias planctónicas: factores que regulan su crecimiento. En Bonilla, S. (ed.), Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Parte I – Generalidades. Documento técnico del PHI-VII N° 16 - UNESCO. 2: 5-11.
- Azevedo, S. M, Carmichael W., Jochimsen E., Rinehart K., Lau S., Shaw G. and Eaglesham G.** 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru/Brazil. Toxicology 181/182: 441-446
- Bonilla, S.** 2009. Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Sylvia Bonilla (editora). UNESCO. Documento Técnico PHI-LAC, N° 1
- Botana, L.M., Lousazo, C., Vilarino, N.** 2015. Climate change and marine and freshwater toxins. De Gruyter. Germany, 490 pp

- Bula, G.** 1985. Florecimientos nocivos de algas verdes-azules en dos lagunas del Departamento del Magdalena. *Revista Ingeniería Pesquera*. 5: 89–99.
- Cavalcante, R.R.D.M., Araújo, M.D., Sales, S.M., Pacheco, C.H.A., Paulino, D.W.** 2008. Análise temporal da densidade de cianobactérias de um reservatório de abastecimento humano. VI Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. Belém
- Castro-Salazar, R; Cordero-Pinchansky, S.** 2002. *Climate Change and Development Case Book, Cases in Latin America Related to the World Market Integration of Atmospheric Carbon Reduction Services and Cleaner Energy*, Series: Environment and Development, ISBN 9968-794-14-7
- Codd, G.A., Lindsay, J., Young, F.M., Morrison, L.F., Metcalf, J.S.** 2005. Harmful Cyanobacteria. From mass mortalities to management measures. En: Huisman, J., H.C. Matthijs y P.M. Visser (eds), *Harmful Cyanobacteria*. Springer, Holanda: 1–24.
- Codd, G.A., Metcalf, J.S., Beattie, K.A.** 1999. Retention of *Microcystisaeruginosa* and microcystin by salad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon*. 37: 1181-1185.
- Correa, I.C.** 2008. Toxicidad de florecimientos de cianobacterias en el embalse RioGrande II. Tesis de Maestría. Grupo de Investigación en Gestión y Modelamiento Ambiental GAIA. Universidad de Antioquia
- De Tezanos Pinto P, Litchman E.** 2010. Eco-physiological responses of nitrogen-fixing cyanobacteria to light. *Hydrobiologia*. 639 (1):63-8.
- Dörr, F.A., Pinto, E., Soares, R.M., Feliciano de Oliveira, S.M., Azevedo, E.** 2010. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon*. 56: 1247–1256.
- Dziallas, C., Pinnow, P., Grossart, H.P.** 2011. Quantification of toxic and toxin-producing cyanobacterial cells by RING-FISH in combination with flow cytometry *Limnology and Oceanography: Methods* 9, p: 67–73
- Echenique, R., Aguilera, A., Giannuzzi, L.** 2014. Problems on drinking water related to toxigenic Cyanobacteria: some cases studied in Argentina. *Advanc. Limnol. Freshwater Phytoplankton of Argentina*. 65, p. 431–444
- EPM, Empresas Públicas de Medellín.** 2005. Cincuenta años de hidrometeorología en Empresas Públicas de Medellín. *Revista Hidrometeorológica*, 1(1):1-150.

- EPM, Empresas Públicas de Medellín.** 2006. Diagnóstico del Estado Ambiental Actual del Embalse Río Grande II. Equipo de Investigación y Soporte Técnico. Área Potabilización Aguas. Antioquia, Colombia.
- EPM, Empresas Públicas de Medellín.** 2015. Informe de avances en el “Estudio de la problemática ambiental de tres embalses de Empresas Públicas de Medellín para la gestión integral y adecuada del recurso hídrico”. Medellín
- Escobar, A. Manjarres, G.** 1985. Estudio de un florecimiento de algas tóxicas en la Ciénaga San Rafael de Buena Vista Magdalena Colombia. *Revista Ingeniería Pesquera*. 5: 17–37.
- Fernandes, V.deO., Cavati, B. de Oliveira, L.B., de Souza, B.D.** 2009. Ecología De Cianobacterias: Factores Promotores E Consequências Das Florações. *Oecologia Australis*. 13: 247–258.
- Ferrari, G., Pérez, M.C., Dabezies, M., Miguez, D., Saizar, C.** 2011. Planktic Cyanobacteria in the Lower Uruguay River , South America. *Fottea*. 11: 225–234.
- Foro Consultivo Científico y Tecnológico.** 2012. Diagnóstico del agua en las américas. ISBN: 978-607-9217-04-4. México, Distrito Federal.
- Fortin, N., Aranda-Rodriguez, R., Jing, H., Pick, F.** 2010. Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria in Missisquoi Bay, Quebec, Canada, Using Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 76, No. 15. p. 5105–5112
- Francis, G.** 1878: Poisonous Australian Lakes. *Nature* 18, 11-12
- Galeano, J., Villalobos, J.** 2010. Cianobacterias y microcistinas en el caribe colombiano: identificación de cianobacterias y detección de microcistinas en el antiguo delta del Río Sinú Córdoba – Colombia. Córdoba, 96 pp.
- GAN, N., HUANG, Q., ZHENG, L., SONG, L.,** 2009. Quantitative assessment of toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural environments using fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Science China. Life Sciences*. Vol.53 No.8: 973–980
- Gómez, E.A., Largo, D.C., Franco, J.D., Román, R., Escorcía, H., Arbeláez, A.C.** 2013. Caracterización de los procesos físicos dominantes en los embalses Porce II, Riogrande II y La Fe.). En: Palacio, J. (ed.), Informe técnico embalse Riogrande II “Estudio de la problemática ambiental de tres embalses de Empresas Públicas de

- Medellín para la gestión integral y adecuada del recurso hídrico”. Universidad de Antioquia, Universidad Nacional sede Medellín, Empresas Públicas de Medellín. Medellín: 1–83.
- González-Muñoz, M.C.** 2012. Estudio del comportamiento temporal de las concentraciones de nitratos, nitritos, amonio, fosfatos, cloruro y sulfatos en el agua de entrada y salida de las plantas de potabilización Manantiales y La Ayurá, mediante cromatografía iónica (CI) con detector de conductividad. Universidad de Antioquia. Medellín
- Gregor J, Marsalek B.** 2004. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. *Water Research*;38(3):517-22.
- Hernández, E., Aguirre, N.J., Palacio, J.A.** 2011. Relación entre la determinación del pigmento Clorofila a y el Biovolumen geométrico algal en un lago de planicie de inundación (Ciénaga de Ayapel, Córdoba-Colombia). *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia.* 60: 159–169.
- Herrera, N.A., Echeverri, L.F., Ferrao-Filho, A.S.** 2015. Effects of phytoplankton extracts containing the toxin microcystin-LR on the survival and reproduction of cladocerans. *Toxicon* 95 (2015) 38-45
- Hudnell, H.K.** 2008. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs.* Springer Science.
- Humpage, A.** 2008. Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. *Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs,* Springer: 383-415
- Hurtado-Alarcón, J.C., Polanía-Vorenberg, J.** 2014. Técnicas moleculares para la detección de cianobacterias en los embalses Riogrande II y La Fe, Colombia. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)* Vol. 62 (1): 403-419
- Jenkins, D.W.** 1976. Impactos ecológicos de las grandes presas. Buenos Aires, en: Comisión Técnico Mixta de Salto Grande. Segunda reunión sobre aspectos de desarrollo ambiental en el proyecto Salto Grande.
- Kaebnick, M., Neilan, B.A.** 2001. Investigaciones ecológicas y moleculares de la producción de cianotoxinas. *FEMS Microbiology Ecology.* 35. 1-9

- Komárek, J., Kastovsky, J., Mares, J., R.Johansen., J.** 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295–335.
- Kruk, C., Huszar, V.L.M., Peeters, E.T.H.M., Bonilla, S., Costa, L., Lurling, M., Reynolds, C., Scheffer, M.** 2010. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology*. 55, pp 614-627
- Larsson, j., Nylander, J.A, Bergman, B.** 2011.Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary, developmental and adaptive traits. *BMC Evol Biol*. 11: 187.
- Lehtimaeki, J., Moisander, P., Sivonen, K. and Kononen, K.** 1997. Growth, nitrogen fixation and nodularin production by two Baltic Sea cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1647-1656.
- Levsky, J.M., Singer, R.H.** 2003. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*. 116 (14). 2833- 2838
- Loaiza-Restano, A.M., Ramírez-Restrepo, J.J., Echenique, R.O., Vallejo, A., Ortiz, L.Y.** 2011. Dinámica espacio-temporal de cuatro especies de *Staurastrum* (Meyen 1829, emed.Ralfs 1848) en un embalse eutrófico colombiano. *Oecologia Australis*. 15(3): 726-746
- López-Muñoz, M.T.** 2015. Dinámica de la estructura del fitoplancton eucariótico en función de las variaciones ambientales en el embalse Riogrande II (Antioquia, Colombia). Tesis de Doctorado. Universidad de Antioquia, Colombia
- Lukac, M. and Aegerter, R.** 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 31, 293-305.
- Mancera, J.E., Vidal, L.A.** 1994. Florecimiento de microalgas relacionado con mortandad masiva de peces en el complejo lagunar Ciénaga Grande de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Anales Instituto Investigaciones Marinas Punta Betín*. 23: 103–117.

- Mandigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J.** 2004. Brock, Biología de los microorganismos. Décima edición. Pearson Prentice Hall. Madrid
- Manzi, M., Rodrigues, S.V.** 2003. Phytoplankton of an eutrophic tropical reservoir: comparison of biomass estimated from counts with chlorophyll-a biomass from HPLC measurements. *Hydrobiologia*. 505: 77–88.
- Márquez, G., Guillot, G.** 2001. Ecología y efecto ambiental de embalses: aproximación con casos colombianos. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, 218 pp.
- Martín, B. Hernández, J.A., López, S., Inda, L.A., Bes, M.T., Fillat, M.F., Peleato, M.L.** 2002. Estudios de homología entre regiones del operón *mcy* de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 y muestras procedentes de La Estanca de Alcañiz (Teruel) *Rev. Real Academia de Ciencias. Zaragoza*. 57: 231–239
- Metcalf, J., Reilly, M., Young, F.M., Cood, Geoffrey.** 2009. Localization of Microcystin synthetase genes in colonies of the cyanobacterium *Microcystis* using Fluorescence *in situ* hybridization. *Journal Phycology*. 45
- Mez, K., Beattie, K.A., Codd, G.A., Hanselmann, K., Hauser, B., Naegeli, H., Preisig, H.R.** 1997. Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *European Journal of Phycology*. 32: 111-117.
- Moreno, I.M., Herrador, M.Á., Atencio, L., Puerto, M., González, A.G., Cameán, A.M.** 2011. Differentiation between microcystin contaminated and uncontaminated fish by determination of unconjugated MCs using an ELISA anti-Adda test based on receiver-operating characteristic curves threshold values: application to Tinca tinca from natural ponds. *Environmental Toxicology*. 26(1):45-56.
- Nellan, B., Pearson, L., Muenchhoff, J., Moffitt, M.,** 2013. Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 15(5), 1239–1253
- Oliver, R.L., Ganf, G.G.** 2002. Freshwater blooms. En: Whitton, B.A. y M. Potts (eds.). *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic, Netherlands: 149–194.
- OMS, Organización Mundial de la Salud.** 1998. Capítulo 7: “Algas cianobacterias en aguas dulces”. Guías para ambientes seguros en aguas recreativas. Volumen 1. Aguas costeras y aguas dulces. Ginebra.

- O'Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J.** 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae*. 14. 313-334
- Oh, H.-M., Lee, S.J., Jang, M.-H. and Yoon, B.-D.** 2000. Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorous-limited chemostat. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 176-179.
- Orr, P.T. and Jones, G.J.** 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1604-1614.
- Palacio, H.M., Ramírez, J.J., Echenique, R.O., Palacio., J.A., Sant'anna, Célia Leite.** 2015. Floristic composition of cyanobacteria in a neotropical, eutrophic reservoir. *Brazilian Journal of Botany*. Springer. DOI 10.1007/s40415-015-0185-3
- Palacio, H.** 2014. Dinámica temporal y espacial de las cianobacterias en el embalse Riogrande II. Tesis de doctorado. Universidad de Antioquia. Medellín.
- Paerl, H.W.** 1988. Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnology and Oceanography*. pp :823-47
- Pizzolon, L.** 1996. Importancia de las cianobacterias como factor de toxicidad de las aguas continentales. *Interciencia. Revista de Ciencia y Tecnología de América*. 21(6): 239-245
- Qiu, Y., Yuan, T., Kon, T., Zurawell, R., Huang, Y., Graham, M., Gabos, S., Pang, X.** 2013. Rapid Detection and Quantitation of Microcystin-Producing *Microcystis* Using Real-Time PCR. *Molecular Biomarkers & Diagnosis*. S5: 006. doi:10.4172/2155-9929.S5-006
- Ramírez, J.J., Gutiérrez, F.L., Vargas, A.** 2005. Respuesta de la comunidad fitoplanctónica a experimentos de eutrofización artificial realizados en la represa La Fe, El Retiro, Antioquia, Colombia. *Caldasia*. 27(1): 103-115.
- Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., Sivonen, K.** 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *PNAS*. Vol 101. No 2. 568–573
- Rantala, A.** 2007. Evolution and Detection of Cyanobacterial Hepatotoxin Synthetase Genes. Department of Applied

Chemistry and Microbiology. Academic Dissertation in Microbiology. University of Helsinki.

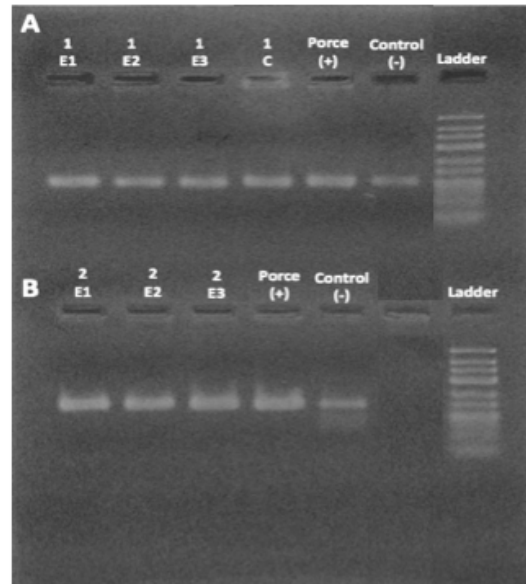
- Rapala, J., Sivonen, K., Luukkainen, R. and Niemelae, S.I.** 1993. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparison of growth by toxic and non-toxic *Anabaena* strains a laboratory study. *J. Appl. Phycol.* 5, 581-591.
- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C. and Niemelae, S.I.** 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2206-2212.
- Reichwaldt, E.S., Ghadouani, A.** 2012. Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: between simplistic scenarios and complex dynamics. *Water research.* 46: 1372–1393.
- Rivera, M., Gómez, L.** 2010. Identificación de cianobacterias potencialmente productoras de cianotoxinas en la Curva de Salguero del Río Cesar. *Revista Luna Azul.* 17–25 pp.
- Rodríguez López, M.L.** 2011. Aislamiento, identificación y cultivo de al menos tres taxones de cianobacterias procedentes de los embalses La Fe, Riogrande II y Porce II. Tesis de Maestría. Grupo de Investigación en Gestión y Modelamiento ambiental, GAIA. Universidad de Antioquia.
- Roldán, G., Ramírez, J.** 2008. *Fundamentos de limnología Neotropical.* Editorial Universidad de Antioquia. Medellín
- Roset, J., Aguayo, S., Muñoz, M.J.** 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología.* 18: 65 - 71
- Saker, M.L., Neilan, B.A. and Gri.ths, D.J.** 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) isolated from Solomon dam, Palm Island, Queensland. *J. Phycol.* 35, 599-606.
- Salas, H., Martino, P.** 1990. *Metodologías Simplificadas para la Evaluación de Eutroficación en Lagos Cálidos Tropicales.* 63 pp.
- Sant’anna CL, Azevedo MT, Agujaro LF, Carvalho MC, Carvalho LR, RC. S.** 2006. Identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. . *Interciência.* 58p.

- Sea-Bird Electronics.** 2013. User's Manual. SBE 25 SEALOGGER CTD, Conductivity, Temperature, and Pressure Recorder with RS-232 Interface. Manual Version #013. Bellevue, Washington 98005 USA
- Sinha, R., Pearson, L.A., Davis, T.W., Burford, M.A., Orr, P.T., Neilan, B.A.** 2012. Increased incidence of *Cylindrospermopsis raciborskii* in temperate zones-is climate change responsible?. *Water research*. 46: 1408–1419.
- Sipari, H., Rantala-Ylinen, A., Jokela, J., Oksanen, I., Sivonen, K.** 2010. Development of a chip assay and quantitative PCR for detecting Microcystin Synthetase E Gene Expression. *Applied and Environmental Microbiology*. June. P 3797-3805
- Sivonen, K. and Jones, G.** 1999. Cyanobacterial toxins. In: *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management* (Chorus, I. and Bartram, J., Eds.), pp. 41-111. E and FN Spoon, London.
- Straub, C., Quillardet, P., Vergalli, J., Tandeau de Marsac, N., Humbert, J-F.** 2011. A day in the life of *Microcystis aeruginosa* Strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. *PloSONE*. 6(1). E16208
- Utkilen, H. and Gjolme, N.** 1995. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 797-800.
- Valério, E., Chambel, L., Paulino, S., Faria, N., Pereira, P., Tenreiro, R.** 2010. Multiplex PCR for detection of microcystins-producing cyanobacteria from freshwater samples. *Environ Toxicol.* Jun;25(3):251-60.
- Vahos, R; Johnson, J; Ramírez, J.J.** 2011. Clasificación trófica y Cinética Temporal de las razones P/B, P/R, R/B Y PPN/PPB en la capa fótica de la presa de un embalse tropical eutrófico. Trabajo de investigación de pregrado. Instituto de Biología. Universidad de Antioquia.
- Van Wagoner, R.M., Drummond, A.K., Wright, J.L.** 2007. Biogenetic diversity of cyanobacterial metabolites. *Advances in applied microbiology* 61: 89-217
- Vásquez, C., Ariza, A., Pinilla, G.** 2006. Descripción del estado trófico de diez humedales del altiplano cundiboyacense. *Revista de la Facultad de Ciencias.* 11: 61–76.

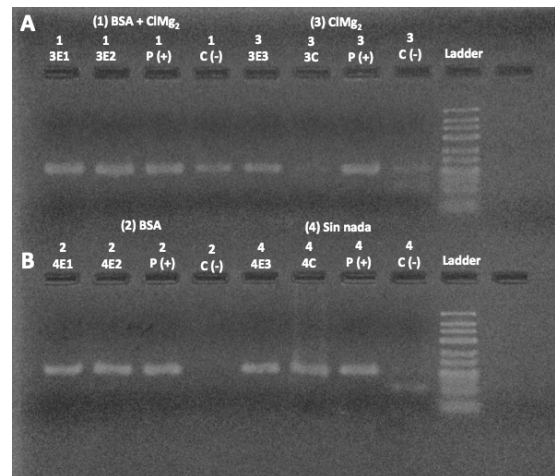
Vollenweider, R. 1968. Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication. Paris.

Zhou, Q., Chen, W., Zhang, Huiyong., Peng., L., Liu, L., Han, Z., Wan, N., Li, L., Song, L. 2012. A flow cytometer based protocol for quantitative analysis of bloom-forming cyanobacteria (*Microcystis*) in lake sediments. *Journal of Environmental Sciences* 24(9) 1709–1716

13. ANEXOS



Anexo 1 Ensayo de verificación del control negativo. **A.** Amplificación del Primer 3 en la Estación 1, 2, 3 y Control en la primera campaña, control positivo: Porce (+) y control Negativo: Control (-) **B.** Amplificación del Primer 4 en la Estación 1, 2, 3 y Control en la primera campaña, control positivo: Porce (+) y control Negativo: Control (-)



Anexo 2 Verificación del CIMg₂ y BSA con el primer 3. **A.** (1)

Anexo 3 Correlación de Spearman

	Nivel Embalse	Densidad	Biovol	Trans. Secchi	Temper	Conduct	pH	Clorofila a	NT. disuelto	N.Or. Dis.Total	Nitratos	Nitritos	N. amoniacal	PT	Ortofos	Hierro
Nivel Embalse	1.00	-0.53	-0.53	-0.26	-0.50	-0.27	-0.27	0.32	-0.98	-0.41	-0.91	-0.77	-0.74	0.17	-0.21	-0.65
Densidad	-0.53	1.00	0.99	0.72	0.38	-0.14	0.07	-0.11	0.51	-0.13	0.28	0.76	0.76	-0.31	0.06	0.48
Biovol	-0.53	0.99	1.00	0.71	0.40	-0.10	0.09	-0.06	0.50	-0.13	0.27	0.76	0.76	-0.27	0.07	0.50
Trans. Secchi	-0.26	0.72	0.71	1.00	0.04	-0.17	0.28	-0.01	0.31	0.01	0.18	0.33	0.38	-0.21	-0.25	0.27
Temper	-0.50	0.38	0.40	0.04	1.00	0.78	-0.03	-0.14	0.54	0.12	0.31	0.51	0.32	-0.06	0.30	0.31
Conduct	-0.27	-0.14	-0.10	-0.17	0.78	1.00	0.27	-0.04	0.36	0.34	0.26	0.06	-0.07	0.02	-0.02	0.07
pH	-0.27	0.07	0.09	0.28	-0.03	0.27	1.00	-0.38	0.36	0.14	0.34	0.16	0.22	-0.50	-0.70	-0.11
Clorofila a	0.32	-0.11	-0.06	-0.01	-0.14	-0.04	-0.38	1.00	-0.38	-0.20	-0.31	-0.31	-0.17	0.32	0.21	0.22
NT. disuelto	-0.98	0.51	0.50	0.31	0.54	0.36	0.36	-0.38	1.00	0.44	0.92	0.73	0.69	-0.24	0.10	0.56
N.Or. Dis.Total	-0.41	-0.13	-0.13	0.01	0.12	0.34	0.14	-0.20	0.44	1.00	0.55	-0.18	0.01	0.20	-0.22	0.32
Nitratos	-0.91	0.28	0.27	0.18	0.31	0.26	0.34	-0.31	0.92	0.55	1.00	0.57	0.52	-0.25	0.07	0.61
Nitritos	-0.77	0.76	0.76	0.33	0.51	0.06	0.16	-0.31	0.73	-0.18	0.57	1.00	0.75	-0.32	0.34	0.50
N. amoniacal	-0.74	0.76	0.76	0.38	0.32	-0.07	0.22	-0.17	0.69	0.01	0.52	0.75	1.00	-0.15	0.16	0.58
PT	0.17	-0.31	-0.27	-0.21	-0.06	0.02	-0.50	0.32	-0.24	0.20	-0.25	-0.32	-0.15	1.00	0.54	0.14
Ortofos	-0.21	0.06	0.07	-0.25	0.30	-0.02	-0.70	0.21	0.10	-0.22	0.07	0.34	0.16	0.54	1.00	0.42
Hierro	-0.65	0.48	0.50	0.27	0.31	0.07	-0.11	0.22	0.56	0.32	0.61	0.50	0.58	0.14	0.42	1.00

Anexo 4 Datos Fluorómetro

Estación 1 - Diciembre 2014						
Profundiad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total
m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.43	19.97	18.02	3.72	0.53	0.45	22.73
0.54	19.97	19.08	2.93	2.52	1.82	26.36
0.67	19.99	22.13	1.24	0	0.39	23.76
0.77	19.99	21.9	2.61	0.25	0.31	25.07
0.92	19.99	17.78	0	0	3.6	21.38
1.01	19.97	23.94	1.55	0	1.27	26.76
1.09	19.97	16.07	1.84	0	3.01	20.92
1.19	19.96	20.28	4.07	0	0.27	24.62
1.3	19.97	16.76	1.42	0	2.27	20.45
1.37	19.96	17.72	1.42	1.1	1.93	22.18
1.46	19.96	17.12	3.82	3.75	0.32	25.01
1.55	19.97	16.02	2.02	0	2.56	20.6
1.64	19.97	18.76	3.17	3.18	0	25.1
1.74	19.98	15.23	2.88	4.94	0	23.06
1.85	19.99	18.23	2.61	2.29	0.67	23.79
1.89	19.96	20.5	2.05	0	2.37	24.93
2.02	19.93	18.4	2.91	0	1.95	23.27
2.16	19.89	15.74	3.85	4.03	0	23.61
2.33	19.87	17.98	3.98	2.56	0.34	24.86
2.51	19.83	18.13	3.76	2.68	0	24.56
2.57	19.8	18.25	3.05	2.8	0.78	24.87
2.76	19.77	17.69	3.5	2.8	0.34	24.33
2.92	19.74	17.78	3.41	0.87	1.51	23.57
3.09	19.72	18.46	2.13	0	1.73	22.32
3.22	19.73	17.02	3.21	2.16	1.1	23.49
3.35	19.73	15.31	2.74	2.37	1.8	22.21
3.45	19.73	17.79	2.29	0	2.17	22.25
3.57	19.72	17.59	3.33	0.91	1.56	23.39
3.69	19.74	18.47	2.13	0.05	2.29	22.93
3.84	19.71	18.26	2.81	0.1	2.25	23.41
3.97	19.71	17.47	2.69	0.83	1.82	22.82
4.06	19.71	17.5	2.45	0.28	2.49	22.72
4.14	19.7	17.7	1.89	0	2.99	22.57
4.25	19.72	16.82	3.18	1.61	1.34	22.95
4.34	19.73	16.95	2.68	1.33	1.22	22.17
4.44	19.71	16.43	2.26	1.54	1.34	21.56

4.55	19.69	16.11	2.86	1.05	1.64	21.65
4.64	19.66	15.92	2.51	0.4	2.01	20.84
4.78	19.64	16.56	2.44	0.14	2.09	21.23
4.92	19.64	16.79	2.63	0.02	1.84	21.27
5	19.61	16.57	2.42	0.63	1.59	21.2
5.11	19.6	17.12	2.12	0	1.98	21.22
5.21	19.57	16.51	2.44	0.49	1.76	21.21
5.33	19.49	14.09	2.79	1.94	0.74	19.56
5.44	19.31	13.79	2.57	1.08	0.8	18.23
5.56	19.09	11.99	2.07	1.59	0.4	16.06
5.68	18.87	11	1.91	0.54	0.87	14.32
5.8	18.64	9.54	1.63	1.42	0.28	12.87
5.97	18.45	9.18	1.27	0.27	0.89	11.61
6.08	18.31	9.58	1.27	0.44	0.68	11.98
6.32	18.17	8.63	1.26	1.14	0.45	11.48
6.51	18.08	8.7	1.15	1.01	0.61	11.46
6.71	18.02	8.82	1.04	0.98	0.44	11.28
6.9	17.88	8.74	1.08	1.33	0.36	11.51
7.07	17.73	9.65	0.96	0.63	0.77	12.02
7.23	17.69	8.03	0.89	1.17	0.45	10.53
7.37	17.65	8.31	0.93	1.04	0.46	10.75
7.61	17.57	6.47	0.94	1	0.4	8.81
7.77	17.54	6.91	1.13	0.72	0.57	9.33
8.08	17.44	4.93	0.64	1	0.32	6.89
8.25	17.36	4.92	0.63	0.91	0.37	6.83
8.34	17.37	4.71	0.69	0.61	0.45	6.46
8.55	17.33	4.15	0.55	0.75	0.38	5.83
8.73	17.25	3.46	0.4	0.99	0.36	5.21
8.84	17.22	3.42	0.59	1.17	0.16	5.34
8.95	17.24	3.91	0.45	0.94	0.28	5.58
9.12	17.28	3.88	0.49	0.99	0.27	5.63
9.27	17.27	3.63	0.6	1.15	0.13	5.5
9.41	17.29	3.33	0.51	1.38	0.16	5.39
9.52	17.27	2.33	0.36	1.49	0	4.19
9.69	17.19	2.81	0.11	0.94	0.34	4.2
9.91	17.11	2.58	0.67	0.84	0.28	4.38
10.14	17.02	2.22	0.37	1.39	0.08	4.07
10.34	16.94	2.06	0.22	1.22	0.18	3.69
10.52	16.93	2.32	0.31	1.27	0.1	4.01
10.69	16.89	2.11	0.18	1.34	0.16	3.79
10.88	16.92	2.41	0.16	1.22	0.18	3.97

11.13	16.93	2.18	0.21	1.37	0.11	3.87
11.3	16.9	2.44	0.15	1.23	0.17	3.99
11.5	16.9	2.35	0.29	1.4	0.17	4.21
11.61	16.9	2.91	0.23	0.88	0.44	4.47
11.72	16.9	2.81	0.72	1.09	0.26	4.88
11.82	16.92	2.53	0.22	1.13	0.25	4.12
11.99	16.91	2.24	0.18	1.29	0.27	3.98
12.13	16.93	2.22	0.33	1.28	0.22	4.06
12.34	16.91	2.44	0.24	1.38	0.24	4.3
12.53	16.87	2.21	0.2	1.38	0.26	4.05
12.66	16.86	2.35	0.18	1.19	0.32	4.04
12.79	16.85	2.59	0.16	1.33	0.26	4.33
12.93	16.87	2.7	0.14	1.03	0.36	4.24
13.15	16.78	3.1	0.11	0.67	0.7	4.59
13.38	16.72	2.37	0.12	1.13	0.37	3.99
13.69	16.68	2.9	0.25	1.17	0.39	4.71
13.93	16.61	2.32	0.12	1.35	0.24	4.03
14.17	16.57	2.22	0.16	1.34	0.1	3.81
14.36	16.57	2.06	0.21	1.24	0.09	3.61
14.59	16.59	1.99	0	0.99	0.38	3.36
14.75	16.58	1.91	0.02	1.21	0.21	3.34
14.95	16.57	2.03	0.2	1.34	0.13	3.71
15.13	16.55	2.73	2.12	1.03	0	5.89
15.38	16.52	1.9	0.49	1.43	0	3.82
15.56	16.53	2.31	0	0.67	0.53	3.51
15.77	16.53	1.85	0.15	1.33	0.13	3.46
15.98	16.5	2.19	0.07	1.14	0.29	3.69
16.15	16.51	1.91	0.03	1.28	0.14	3.35
16.31	16.53	1.68	0.01	0.98	0.33	3
16.54	16.52	2.03	0.16	1.13	0.23	3.54
16.81	16.47	2.21	0.09	0.81	0.46	3.57
16.99	16.44	1.91	0.08	1.11	0.23	3.33
17.15	16.41	1.42	0.03	1.29	0.12	2.86
17.39	16.41	1.63	0	1.19	0.17	2.98
17.54	16.4	1.59	0.2	1.38	0.11	3.28
17.7	16.4	1.22	0.05	1.27	0.13	2.67
17.8	16.4	2.01	0.07	0.94	0.29	3.31
17.92	16.44	1.94	0.13	1.35	0	3.42
18.07	16.43	1.65	0.13	1.09	0.12	2.99
18.25	16.39	1.8	0.1	0.01	0.69	2.61
18.41	16.36	1.32	0.33	1.01	0	2.66

18.62	16.35	1.41	0.15	0.89	0.12	2.56
18.78	16.36	1.47	0.23	1.1	0	2.8
18.92	16.39	1.23	0.25	0.94	0.05	2.47
19.05	16.39	1.33	0.05	0.73	0.22	2.32
19.23	16.37	1.41	0.25	0.81	0.16	2.63
19.28	16.33	1.31	0.17	1.03	0	2.51
19.48	16.29	1.43	0.09	0.79	0.09	2.4
19.69	16.26	1.06	0.24	1.12	0	2.41
19.83	16.23	1.4	0.09	0.77	0.24	2.49
19.88	16.24	1.26	0.18	0.94	0.07	2.44
20.03	16.28	1.18	0.13	0.9	0.07	2.27
20.19	16.29	1.26	0.13	0.73	0.2	2.31
20.39	16.25	1.27	0.08	0.93	0.14	2.42
20.42	16.23	1.56	0.15	0.91	0.1	2.72
20.58	16.24	1.52	0.27	1.06	0	2.85
20.64	16.23	1.38	0.28	1.17	0	2.84
20.71	16.26	1.59	0.21	0.92	0	2.73
20.72	16.28	1.67	0.31	1.02	0.06	3.06
20.73	16.31	1.15	0.05	0.9	0.08	2.17
20.7	16.33	1.2	0.11	0.79	0.13	2.23
20.7	16.38	1.11	0.11	1.04	0	2.27
20.69	16.41	1.36	0	0.84	0.11	2.31
20.71	16.46	1.48	0.07	0.61	0.25	2.41
20.73	16.43	1.19	0.08	0.92	0.08	2.27
20.73	16.39	1.1	0.03	0.78	0.12	2.02
20.76	16.36	1.43	0.11	0.85	0.12	2.52
20.77	16.33	1.12	0.08	0.97	0.13	2.3
20.8	16.32	1.2	0.04	0.82	0.22	2.28
20.84	16.33	1.72	0.67	0.62	0.21	3.22
20.87	16.3	1.13	0.22	1.11	0.01	2.47
20.92	16.29	1.42	0.04	0.77	0.22	2.44
21.02	16.27	1.95	0.08	0.02	0.6	2.65
21.09	16.25	1.25	0.1	0.92	0.11	2.37
21.11	16.28	1.26	0.18	0.99	0.06	2.48
21.18	16.3	1.14	0.21	1.14	0.07	2.55
21.27	16.32	1.3	0.16	0.93	0	2.39
21.33	16.31	1.65	0.01	0.75	0.25	2.66
21.43	16.29	0.96	0.14	0.85	0.13	2.08
21.48	16.3	1.3	0.11	0.84	0.13	2.38
21.51	16.32	1.17	0	0.91	0.27	2.35
21.6	16.26	1.56	0.18	1.04	0	2.78

21.68	16.24	1.26	0.13	0.76	0.21	2.37
21.78	16.23	1.02	0.17	0.93	0.18	2.3
21.77	16.22	1.48	0.12	0.83	0.11	2.54
21.79	16.24	1.02	0.05	0.98	0.12	2.16
21.81	16.27	1.59	0	0.63	0.38	2.6
21.91	16.22	1.05	0.03	0.83	0.18	2.08
21.99	16.19	1.25	0.06	0.8	0.17	2.27
22.02	16.19	1.49	0	0.7	0.19	2.38
22.14	16.18	1.14	0.04	0.81	0.25	2.24
22.21	16.13	1.54	0	0.63	0.32	2.49
22.36	16.12	1.25	0	0.8	0.23	2.29
22.43	16.14	1.23	0.07	0.8	0.26	2.36
22.55	16.13	0.82	0.09	0.89	0.24	2.04
22.72	16.12	1.18	0.22	0.95	0.13	2.47
22.94	16.08	1.1	0.09	0.89	0.19	2.27
23.07	16.07	1.28	0.42	1.11	0	2.81
23.22	16.06	0.75	0.23	1.3	0.02	2.31
23.37	16.03	1.39	0.21	1.06	0.11	2.77
23.47	16.06	1.19	0.13	0.99	0.21	2.52
23.59	16.05	1.09	0.07	0.94	0.2	2.29
23.72	16.06	1.14	0.08	0.9	0.19	2.3
23.83	16.05	1.16	0.02	0.89	0.15	2.22
23.93	16.06	0.87	0.26	1.1	0.06	2.3
23.99	16.05	0.62	0.21	1.17	0.15	2.15
24.1	16.04	1.13	0	0.88	0.22	2.24
24.18	16.04	1.16	0.09	0.99	0.08	2.32
24.26	16.06	1.27	0.04	0.84	0.15	2.3
24.34	16.06	1.3	0.05	0.96	0.19	2.5
24.41	16.05	1.09	0.2	1.06	0.11	2.46
24.48	16.06	1.53	0.14	1.04	0.18	2.89
24.54	16.09	1.19	0.13	1.11	0.07	2.49
24.6	16.06	1.15	0.13	1.05	0.08	2.41
24.7	16.02	1.04	0.05	0.74	0.25	2.07
24.8	16	1.09	0.08	1.03	0.16	2.37
24.95	15.99	0.91	0.17	1.21	0.02	2.32
25.07	15.97	1.24	0	0.74	0.28	2.27
25.13	15.98	1.22	0.07	0.91	0.17	2.36
25.26	15.96	1.09	0.07	0.9	0.17	2.23
25.38	15.96	1.08	0.09	0.88	0.23	2.28
25.58	15.95	1.3	0	0.76	0.3	2.36
25.74	15.95	1.36	0.01	0.76	0.3	2.43

25.92	15.96	1.25	0.11	0.99	0.09	2.44
26.08	15.97	0.87	0.15	1.22	0	2.23
26.23	15.95	1.44	0	0.7	0.21	2.35
26.38	15.96	0.89	0.13	0.98	0.11	2.11
26.41	15.93	1.19	0.07	0.82	0.18	2.26
26.47	15.96	1.08	0.09	0.82	0.19	2.18
26.57	15.95	1.27	0.15	0.82	0.16	2.39
26.72	15.96	1.12	0.08	0.73	0.23	2.17
26.9	15.95	1.24	0.04	0.7	0.19	2.17
27.08	15.93	1.07	0.08	0.79	0.16	2.09
27.22	15.91	0.72	0.29	1.06	0	2.07
27.37	15.92	1.22	0.02	0.62	0.37	2.23
27.48	15.91	1.15	0.1	0.65	0.29	2.19
27.62	15.91	1.2	0.2	0.83	0.14	2.36
27.77	15.91	0.79	0.12	0.66	0.24	1.82
27.89	15.9	0.87	0.15	0.84	0.16	2.02
28.04	15.89	0.84	0.15	0.65	0.29	1.92
28.18	15.88	0.91	0.23	0.55	0.17	1.86
28.28	15.89	0.82	0.27	0.71	0.1	1.9
28.41	15.89	0.95	0.24	0.54	0.2	1.93
28.54	15.87	0.83	0.27	0.55	0.16	1.81
28.69	15.88	1.49	0.38	0.29	0.38	2.54
28.9	15.85	0.91	0.3	0.41	0.34	1.96
29.01	15.84	0.87	0.38	0.58	0.17	2
29.1	15.84	0.95	0.32	0.39	0.22	1.88
29.23	15.85	1.08	0.33	0.42	0.19	2.01
29.38	15.84	0.99	0.3	0.39	0.22	1.9
29.54	15.82	0.84	0.33	0.48	0.19	1.84
29.65	15.82	1.2	0.39	0.56	0.2	2.35
29.81	15.83	0.77	0.5	0.68	0.04	1.99
29.97	15.8	1.06	0.4	0.48	0.2	2.14
30.1	15.8	0.78	0.45	0.53	0.15	1.91
30.13	15.8	0.88	0.53	0.73	0.01	2.15
30.16	15.82	0.99	0.5	0.61	0.06	2.15
30.13	15.83	1.43	0.29	0.24	0.39	2.34
30.13	15.85	0.85	0.42	0.49	0.15	1.91
30.16	15.86	1.18	0.52	0.55	0.08	2.33
30.15	15.87	0.55	0.69	0.72	0.16	2.12
30.17	15.85	0.99	0.38	0.47	0.19	2.04
30.17	15.85	0.95	0.4	0.19	0.35	1.89
30.17	15.85	0.85	0.66	0.28	0.31	2.1

30.18	15.87	0.78	0.57	0.66	0.13	2.13
30.16	15.89	0.92	0.41	0.39	0.24	1.96
30.18	15.91	1.05	0.37	0.24	0.31	1.98
30.2	15.9	1	0.38	0.46	0.22	2.05
30.2	15.88	0.82	0.55	0.75	0.09	2.2
30.2	15.9	1.11	0.29	0	0.55	1.95

Estación 1 - Marzo 2015						
Profundidad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total
m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.08	20.2	39.95	0.97	7.38	0	48.3
0.15	20.21	49.24	1.42	2.9	0.45	54.01
0.28	20.2	46.56	0.93	5.27	0	52.76
0.42	20.19	47.29	0	0	2.83	50.11
0.56	20.18	45.29	0	4.72	2.57	52.57
0.66	20.18	47.32	1.88	6.48	0	55.68
0.76	20.19	50.32	0	0	3.72	54.03
0.86	20.19	50.86	0.09	0	3.25	54.2
0.95	20.19	52.79	0.07	0	3.32	56.18
1.03	20.19	51.22	1.26	3.01	1.91	57.39
1.1	20.17	53.19	1.37	3.02	1.85	59.43
1.21	20.18	55.61	0	0.07	3.47	59.15
1.24	20.19	56.37	0	0	3.64	60.01
1.26	20.19	52.51	0	3.57	3	59.08
1.32	20.18	57.56	0	0	3.89	61.45
1.45	20.18	52.36	1.24	5.66	1.4	60.65
1.58	20.18	56.39	0	1.76	2.87	61.01
1.72	20.18	56.55	1.74	1.49	1.77	61.54
1.87	20.17	53.45	1.25	4.88	1.5	61.07
2.04	20.16	52.67	0.19	2.24	3.39	58.5
2.27	20.16	54.17	0.02	0.28	3.3	57.76
2.43	20.15	54.4	0.03	0.57	3.12	58.12
2.62	20.13	53.06	2.91	0.9	2.71	59.59
2.79	20.12	50.74	0.66	2.77	2.27	56.44
3	20.1	49.09	0.24	2.36	2.74	54.44
3.12	20.1	47.96	0.26	1.32	2.33	51.87
3.28	20.08	48.47	0.19	2.35	1.66	52.67
3.44	20.04	49.23	0	1.17	2.73	53.13
3.64	20.04	47.64	0.34	1.38	2.12	51.49
3.78	20.04	46.23	0.62	2.64	1.25	50.74
3.88	20.02	48.45	0.35	0.83	2.4	52.03

4.02	19.99	47.25	0.31	1.6	1.81	50.97
4.12	19.98	45.3	0	1.43	2.21	48.93
4.28	19.96	45.8	0.01	0.37	2.54	48.72
4.4	19.96	42.54	0.71	2.36	1.37	46.99
4.55	19.96	44.61	0.16	0.66	2.02	47.45
4.57	19.92	42.04	0.22	1.16	1.69	45.11
4.59	19.91	40.4	0.21	1.23	1.68	43.52
4.64	19.89	40.45	0.26	1.17	1.64	43.52
4.69	19.87	39.9	0.35	1.44	1.32	43.01
4.8	19.85	37.71	0.26	1.19	1.4	40.55
4.92	19.86	39.26	0.37	0.97	1.66	42.27
5.01	19.85	39.15	0.25	0.57	1.76	41.73
5.06	19.86	37.89	0.07	1.28	1.67	40.91
5.09	19.84	38.46	0.04	0.56	1.71	40.77
5.15	19.84	37.51	0.22	1.08	1.64	40.45
5.42	19.8	36.64	0.19	0.75	1.71	39.3
5.58	19.68	35.85	0.31	0.71	1.65	38.53
5.69	19.66	35.09	0.51	1.54	1.08	38.22
5.82	19.69	36.61	0.55	1.33	1.34	39.83
5.94	19.67	35.33	0.58	1.22	1.28	38.41
6.07	19.64	34.7	0.48	1.13	1.33	37.64
6.17	19.62	32.03	0.41	1.04	1.45	34.93
6.26	19.57	31.98	0.74	1.17	1.12	35.01
6.39	19.57	30.34	0.53	1	1.35	33.22
6.5	19.54	29.89	0.62	1.73	0.86	33.11
6.55	19.45	20.02	0.44	1.29	0.74	22.5
6.73	19.37	20.79	0.52	1.64	0.72	23.67
6.88	19.33	21.6	0.3	1.18	0.97	24.05
7.01	19.28	21.49	0.37	0.66	1.31	23.83
7.03	19.2	18.06	0.17	0.58	1.19	19.99
7.11	19.19	11.48	0.15	1.21	0.85	13.69
7.2	19.18	17.31	0.29	0.58	1.06	19.24
7.34	19.15	20.36	0.49	1.39	0.66	22.9
7.42	19.03	16.82	0.61	1	0.41	18.85
7.44	18.87	11.05	0.13	0.38	0.79	12.35
7.44	18.73	8.08	0.18	0.34	0.64	9.24
7.48	18.69	5.98	0.4	0.93	0.22	7.53
7.54	18.64	5.56	0.28	0.74	0.38	6.96
7.56	18.53	5.13	0.36	0.78	0.22	6.5
7.59	18.43	4.56	0.36	0.58	0.19	5.7
7.59	18.4	4.07	0.31	0.41	0.35	5.15

7.61	18.38	4.05	0.35	0.63	0.17	5.21
7.6	18.34	3.93	0.37	0.56	0.17	5.04
7.61	18.29	3.78	0.22	0.42	0.34	4.77
7.61	18.26	3.63	0.45	0.76	0.02	4.86
7.62	18.26	3.32	0.35	0.68	0.22	4.58
7.62	18.26	3.57	0.24	0.04	0.44	4.3
7.63	18.26	2.91	0.41	0.79	0.09	4.21
7.64	18.24	2.56	0.47	0.73	0.13	3.89
7.66	18.22	2.8	0.36	0.52	0.15	3.84
7.67	18.2	2.96	0.36	0.38	0.24	3.93
7.71	18.17	2.81	0.41	0.5	0.16	3.89
7.74	18.15	2.38	0.31	0.65	0.23	3.56
7.74	18.14	2.33	0.5	0.89	0	3.72
7.77	18.13	2.55	0.36	0.49	0.22	3.62
8.03	18.05	2.21	0.4	0.57	0.1	3.28
8.23	17.97	2.25	0.37	0.25	0.2	3.07
8.48	17.92	2.07	0.42	0.5	0.04	3.03
8.69	17.84	2.11	0.46	0.4	0.04	3.01
8.76	17.84	2.16	0.42	0.42	0.02	3.02
8.78	17.88	2.41	0.34	0.1	0.21	3.04
8.8	17.93	2.47	0.35	0	0.19	3.02
8.84	17.97	2.14	0.4	0.24	0.11	2.89
8.85	17.99	1.73	0.35	0.37	0.14	2.59
8.85	17.97	2.45	0.47	0.27	0.1	3.29
8.85	17.96	2.21	0.38	0.16	0.17	2.92
8.85	17.94	2.14	0.4	0.33	0.07	2.93
8.86	17.91	2.15	0.47	0.38	0	3
8.86	17.88	2.12	0.44	0.4	0.06	3.02
8.85	17.88	2.12	0.4	0.32	0.05	2.9
8.87	17.88	2.03	0.41	0.35	0.05	2.84
8.88	17.86	2.17	0.42	0.4	0.04	3.04
8.88	17.87	2.49	0.39	0.19	0.14	3.22
8.88	17.9	2.13	0.4	0.33	0.09	2.95
8.87	17.92	2.04	0.46	0.42	0	2.92
8.91	17.89	2.1	0.43	0.33	0.06	2.91
8.92	17.86	2.11	0.37	0.27	0.1	2.84
8.93	17.86	2.27	0.41	0.31	0.09	3.08
8.95	17.87	2.14	0.44	0.34	0.04	2.96
9.09	17.81	2.2	0.42	0.3	0.08	3
9.13	17.77	2.02	0.46	0.47	0	2.95
9.19	17.77	2.24	0.49	0.37	0	3.1

9.35	17.73	2.38	0.45	0.35	0	3.19
9.55	17.71	2	0.36	0.31	0.12	2.78
9.78	17.71	1.92	0.36	0.29	0.1	2.68
10	17.68	1.24	0.36	0.37	0.04	2.01
10.22	17.63	1.29	0.42	0.34	0	2.05
10.29	17.54	1.1	0.37	0.23	0.04	1.74
10.39	17.53	1.08	0.37	0.38	0	1.83
10.56	17.5	1.15	0.38	0.29	0	1.82
10.72	17.48	1.14	0.4	0.35	0	1.89
11.02	17.37	1.15	0.34	0.28	0.04	1.8
11.08	17.31	0.98	0.33	0.37	0.04	1.72
11.4	17.29	0.99	0.35	0.37	0	1.72
11.71	17.25	0.94	0.32	0.39	0	1.66
12	17.19	0.98	0.29	0.43	0.02	1.72
12.15	17.18	1.05	0.23	0.23	0.1	1.62
12.37	17.2	1.1	0.28	0.4	0.01	1.79
12.59	17.14	1.02	0.26	0.38	0	1.67
12.71	17.12	1.2	0.23	0.24	0.07	1.74
12.96	17.07	1.14	0.25	0.29	0.03	1.71
13.13	17.03	1.29	0.12	0.2	0.15	1.77
13.3	17.02	1.26	0.2	0.35	0.02	1.84
13.44	17.04	1.23	0.23	0.37	0.01	1.84
13.69	16.96	1.34	0.13	0.22	0.1	1.8
13.71	16.88	1.34	0.16	0.3	0.06	1.86
13.73	16.91	1.19	0.21	0.33	0.01	1.73
13.92	16.89	1.24	0.12	0.31	0.1	1.77
14.22	16.8	1.59	0.15	0.32	0.08	2.13
14.52	16.75	1.69	0.13	0.28	0.07	2.17
14.76	16.71	1.8	0.14	0.39	0.05	2.38
15.05	16.69	1.9	0.09	0.28	0.11	2.38
15.38	16.64	1.74	0.05	0.38	0.12	2.3
15.68	16.59	2.07	0.1	0.28	0.15	2.6
15.92	16.56	1.89	0.04	0.16	0.18	2.27
16.19	16.54	1.71	0.07	0.28	0.14	2.2
16.28	16.53	1.73	0.09	0.43	0.04	2.29
16.52	16.52	1.93	0.1	0.32	0.09	2.44
16.86	16.52	1.93	0.02	0.2	0.19	2.34
17.21	16.47	1.92	0.06	0.32	0.13	2.43
17.5	16.43	2.11	0.06	0.26	0.17	2.6
17.85	16.39	2.1	0.07	0.25	0.11	2.53
18.19	16.39	1.92	0.06	0.38	0.07	2.42

18.58	16.36	1.91	0	0.2	0.16	2.28
18.91	16.35	1.9	0.06	0.29	0.12	2.37
19.2	16.33	1.74	0.05	0.31	0.11	2.22
19.41	16.33	1.65	0.07	0.39	0.04	2.16
19.57	16.33	1.84	0	0.16	0.22	2.22
19.63	16.35	1.6	0	0.21	0.2	2.01
19.89	16.32	1.63	0	0.21	0.16	2
20.22	16.28	1.79	0.07	0.42	0.09	2.37
20.58	16.27	1.77	0.09	0.47	0.04	2.37
20.84	16.26	1.77	0.1	0.44	0.01	2.33
21.11	16.29	2	0	0.17	0.2	2.37
21.31	16.25	1.75	0	0.3	0.15	2.21
21.5	16.24	1.44	0.05	0.28	0.11	1.88
21.74	16.25	1.62	0.07	0.36	0.08	2.12
22.1	16.24	1.99	0.04	0.2	0.14	2.36
22.37	16.2	1.66	0.07	0.29	0.08	2.1
22.59	16.21	1.68	0	0.13	0.16	1.97
22.87	16.21	1.65	0.09	0.38	0.03	2.15
23.17	16.22	1.79	0.03	0.19	0.17	2.18
23.51	16.21	1.63	0.06	0.22	0.13	2.03
23.77	16.19	1.55	0.07	0.25	0.09	1.96
24.1	16.18	1.43	0.12	0.44	0	1.99
24.2	16.15	1.55	0	0.07	0.17	1.79
24.26	16.21	1.32	0.03	0.3	0.06	1.72
24.27	16.21	1.73	0.11	0.16	0	2
24.31	16.26	1.4	0.12	0.32	0	1.84

Estación 1 - Abril 2015						
Profundidad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total
m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.16	20.26	0	18.06	0	35.36	53.42
0.23	20.32	0	18.42	0	37.25	55.67
0.47	20.39	0	16	0	33.76	49.76
0.54	20.4	0	16.94	0	39.03	55.97
0.65	20.39	0	13.15	0	38.85	52
0.76	20.38	0	22.72	0	40.49	63.21
0.95	20.41	0	10.94	0	42.07	53.01
1.29	20.44	0	19.73	0	33.49	53.22
1.4	20.43	0	16.96	0	36.44	53.4
1.62	20.48	0	18.01	0	38.31	56.32

1.78	20.46	0	18.25	0	36.37	54.63
1.94	20.48	0	14.89	0	34.46	49.35
2.14	20.48	0	17.83	0	32.48	50.32
2.27	20.47	0	15	0	34.11	49.11
2.43	20.49	0	13.34	0	34.65	47.99
2.56	20.48	0	15.52	0	30.45	45.98
2.67	20.46	0	17.89	0	30.13	48.02
2.84	20.46	0	14.72	0	34.28	49
3.01	20.45	0	14.52	0	28.48	43.01
3.16	20.44	0	16.21	0	26.36	42.57
3.32	20.44	0	16.01	0	34.79	50.81
3.49	20.43	0	15.46	0	30.77	46.24
3.6	20.42	0	14.9	0	31.35	46.26
3.75	20.4	0	13.56	0	35.83	49.39
3.79	20.38	0	12.57	0	32.94	45.51
3.92	20.38	0	11.87	0	32.66	44.53
4.06	20.38	0	13.74	0	33.7	47.45
4.22	20.37	0	14.94	0	33	47.93
4.38	20.37	0	11.39	0	32.38	43.78
4.53	20.37	0	14.37	0	28.6	42.97
4.73	20.36	0	13.78	0	31.2	44.98
4.85	20.27	0	11.4	0	27.98	39.37
4.94	20.14	0	11.11	0	22.16	33.27
5.04	20.02	0	12.55	0	19.87	32.42
5.1	20	0	10.61	0	17.81	28.41
5.24	19.97	0	10.24	0	16.93	27.17
5.38	19.74	0	10.25	0	15.28	25.53
5.53	19.54	0	6.88	0	18.6	25.48
5.64	19.3	0	6.29	0	14.62	20.91
5.76	19.04	0	5.31	0	14.68	19.99
5.86	18.82	0	4.65	0	13.76	18.42
5.92	18.66	0	6.37	0	12.41	18.79
6.03	18.66	0	7.27	0	10.49	17.76
6.13	18.7	0	6.87	0	9.45	16.31
6.22	18.65	0	4.46	0	8.97	13.43
6.33	18.63	0	8.44	0	3.59	12.03
6.41	18.46	0	6.34	0	4.88	11.21
6.55	18.24	0	5.77	0	3.23	9
6.65	18.13	0	4.85	0	1.28	6.13
6.72	18.07	0	4.3	0	2.72	7.02
6.8	17.99	0	3.81	0	3.58	7.39

6.89	17.95	0	6.89	0	0.24	7.13
7.03	17.91	0	5.49	0	0.94	6.43
7.1	17.85	0	6.39	0	0	6.39
7.17	17.87	0	6.57	0	0	6.57
7.23	17.96	0	6.48	0	0	6.48
7.32	17.99	0	5.91	0	0	5.91
7.47	17.88	0	6.45	0	0	6.45
7.58	17.8	0	6.14	0	0.46	6.6
7.73	17.71	0	5.48	0	0	5.48
7.87	17.69	0	5.37	0	0	5.37
7.95	17.69	0	5.41	0	0	5.41
8.05	17.71	0	5.29	0	0	5.29
8.17	17.71	0	5.64	0	0	5.64
8.29	17.68	0	5.09	0	0	5.09
8.42	17.63	0	3.8	0	0.92	4.72
8.52	17.57	0	4.51	0	0	4.51
8.7	17.53	0	4.86	0	0	4.86
8.88	17.5	0	4.64	0	0	4.64
9.05	17.5	0	4.23	0	0	4.23
9.23	17.46	0	4.16	0	0	4.16
9.37	17.41	0	4.29	0	0	4.29
9.48	17.38	0	4.28	0	0	4.28
9.68	17.33	0	4.68	0	0	4.68
9.79	17.29	0	4.51	0	0	4.51
9.97	17.28	0	4.5	0	0	4.5
10.22	17.17	0	5	0	0	5
10.37	17.15	0	4.58	0	0	4.58
10.41	17.17	0	6.14	0	0	6.14
10.5	17.18	0	4.43	0	0	4.43
10.73	17.18	0	5.52	0	0	5.52
10.86	17.17	0	4.54	0	0	4.54
10.95	17.17	0	4.25	0	0	4.25
11.23	17.15	0	4.63	0	0	4.63
11.46	17.09	0	4.73	0	0	4.73
11.6	17.07	0	4.34	0	0	4.34
11.73	17.08	0	4.48	0	0	4.48
11.91	17.09	0	4.27	0	0	4.27
12.05	17.07	0	4.59	0	0	4.59
12.21	17.05	0	4.88	0	0	4.88
12.4	17.01	0	4.85	0	0	4.85
12.55	16.98	0	4.72	0	0	4.72

12.71	16.97	0	4.81	0	0	4.81
12.88	16.96	0	4.61	0	0	4.61
13.02	16.95	0	4.5	0	0	4.5
13.19	16.94	0	4.69	0	0	4.69
13.36	16.93	0	4.96	0	0	4.96
13.59	16.93	0	5.35	0	0	5.35
13.76	16.87	0	5.35	0	0	5.35
13.94	16.84	0	5.31	0	0	5.31
14.13	16.81	0	4.14	0	0	4.14
14.32	16.8	0	4.7	0	0	4.7
14.53	16.8	0	4.32	0	0	4.32
14.71	16.8	0	5.54	0	0	5.54
14.93	16.75	0	5.16	0	0.11	5.27
15.18	16.73	0	5.1	0	0	5.1
15.48	16.72	0	4.74	0	0	4.74
15.77	16.68	0	4.75	0	0	4.75
16.02	16.67	0	4.77	0	0	4.77
16.26	16.65	0	4.01	0	0	4.01
16.52	16.61	0	4.25	0	0	4.25
16.8	16.58	0	4.62	0	0	4.62
17.1	16.57	0	4.36	0	0	4.36
17.38	16.54	0	4.48	0	0	4.48
17.63	16.52	0	3.9	0	0	3.9
17.84	16.54	0	4.3	0	0	4.3
18.04	16.5	0	4.09	0	0	4.09
18.23	16.5	0	4.65	0	0	4.65
18.4	16.47	0	5.05	0	0	5.05
18.65	16.46	0	5.25	0	0	5.25
18.89	16.46	0	4.9	0	0	4.9
19.11	16.47	0	4.97	0	0	4.97
19.36	16.47	0	5.1	0	0	5.1
19.54	16.48	0	5.14	0	0	5.14
19.73	16.49	0	4.99	0	0	4.99
19.91	16.49	0	4.55	0	0	4.55
20.08	16.44	0	4.62	0	0	4.62
20.24	16.43	0	5.03	0	0	5.03
20.44	16.41	0	5.02	0	0	5.02
20.61	16.37	0	5.34	0	0	5.34
20.81	16.35	0	5.72	0	0	5.72
20.99	16.34	0	5.59	0	0	5.59
21.19	16.34	0	5.13	0	0	5.13

21.33	16.31	0	5.44	0	0	5.44
21.51	16.29	0	4.96	0	0.2	5.17
21.68	16.29	0	4.18	0	1.15	5.33
22.06	16.27	0	6.06	0	0	6.06
22.36	16.24	0	5.78	0	0	5.78
22.66	16.24	0	5.95	0	0	5.95
22.93	16.24	0	6.34	0	0	6.34
23.15	16.24	0	6.01	0	0	6.01
23.38	16.23	0	5.57	0	1.31	6.88
23.58	16.22	0	5.15	0	0.55	5.7
23.8	16.23	0	4.63	0	1.55	6.18
24.06	16.24	0	4.95	0	0.83	5.78
24.32	16.22	0	4.6	0	0.79	5.39
24.59	16.21	0	4.38	0	2.04	6.42
24.87	16.19	0	3.98	0	2.15	6.13
25.16	16.17	0	3.05	0	3.3	6.35
25.49	16.14	0	3.88	0	1.43	5.31
25.73	16.14	0	3.25	0	1.66	4.92
25.93	16.12	0	3.51	0	2.05	5.56
26.26	16.12	0	1.91	0	3.4	5.31

Estación 1 - Mayo 2015						
Profundiad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total
m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.6	21.38	19.42	3.23	0	13.56	36.21
0.86	21.37	10.7	7.52	0	20.22	38.44
1.13	21.33	4.25	7.98	0	26.38	38.62
1.43	21.28	16.77	8.56	0	21.9	47.24
1.6	21.2	24.98	9.19	0	16.15	50.31
1.78	21.19	27.26	9.24	0	14.23	50.73
1.96	21.19	16.17	9.73	0	17.31	43.21
2.11	21.18	25.96	7.13	0	13.13	46.22
2.24	21.17	25.22	12.64	0	9.15	47.01
2.38	21.16	26.41	9.1	0	11.23	46.75
2.52	21.16	28.43	7.72	0	13.84	49.99
2.68	21.17	31.24	8.89	0	10.93	51.06
2.83	21.17	31.71	5.8	0	12.04	49.54
3.04	21.13	29.68	9.91	0	9.57	49.16
3.19	21.11	23.34	10.19	0	14.33	47.86

3.45	21.07	24.03	9.62	0	12.86	46.51
3.64	21.07	23.61	12.16	0	12.23	49
3.85	21.05	27.74	10.56	0	11.68	49.98
4.06	21.04	32.58	10.84	0	9.62	53.05
4.26	21.04	24.47	8.36	0	13.16	46
4.54	21.03	13.61	8.46	0	14.26	36.32
4.79	20.96	5.81	9.35	0	13.36	28.52
5.1	20.84	11.83	6.41	0	10.9	29.13
5.33	20.68	11.47	5.68	0	11.45	28.6
5.59	20.28	15.62	2.54	0	9.88	28.04
5.76	19.88	8.36	1.89	0	11.84	22.09
5.86	19.82	1.22	1.19	0	13.99	16.4
6.09	19.78	4.01	0.8	0	13.07	17.88
6.41	19.39	0	2.85	0	8.09	10.94
6.77	19.06	0	0.84	0	8.98	9.82
7.14	18.82	0	2.29	0	5.75	8.04
7.45	18.55	0	3.73	0	2.33	6.06
7.82	18.34	0	4.82	0	1.14	5.96
8.16	18.15	0	5.87	0	0.32	6.19
8.56	18.05	0	5.01	0	0.47	5.48
8.91	17.93	0	3.14	0	2.9	6.05
9.19	17.9	0	2.18	0	4.37	6.55
9.53	17.88	0	2.41	0	3.82	6.23
9.96	17.73	0	2.37	0	3.34	5.71
10.34	17.62	0	2.12	0	2.87	5
10.74	17.54	0	3.31	0	2.12	5.43
11	17.47	0	3.08	0	2.56	5.64
11.26	17.37	0	2.49	0	2.78	5.27
11.78	17.29	0	3.2	0	2.53	5.73
12.28	17.22	0	3.49	0	2.36	5.85
12.84	17.16	0	2.45	0	3.35	5.8
13.18	17.1	0	3.15	0	3.58	6.72
13.52	17.11	0	4.06	0	2.29	6.34
13.87	17.1	0	3.14	0	2.95	6.09
14.22	17.04	0	5.04	0	2.69	7.73
14.69	16.95	0	3.35	0	2.06	5.4
15.29	16.91	0	3.03	0	2.69	5.73

Estación 2 - Diciembre 2014						
Profundiad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total

m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.15	19.91	10.62	0	3.39	2.4	16.41
0.3	19.91	12.8	0	3.1	1.89	17.79
0.53	19.9	13.97	0	0	3.74	17.71
0.73	19.91	13.56	0	1.26	3.61	18.43
0.98	19.91	12.83	0	1.56	3.08	17.46
1.03	19.9	14.06	0	0.97	2.82	17.85
1.13	19.88	13.09	0	0	3.59	16.68
1.31	19.9	13.63	0	0	3.74	17.37
1.48	19.88	12.73	0	2.01	3.16	17.91
1.69	19.72	13.59	0	0	4.16	17.75
1.89	19.57	13.08	0	1.39	3.79	18.26
2.04	19.44	11.2	0	2.53	4.09	17.81
2.33	19.28	14.18	0	0	4.59	18.77
2.63	18.99	10.39	0	0	4.15	14.55
2.79	18.76	9.59	0	0	3.87	13.46
3.25	18.54	6.54	0.09	0	4.09	10.72
3.59	18.28	5.9	0.58	0	3.94	10.42
3.87	18.16	5.01	0.45	0	3.58	9.04
4.15	18.04	4.01	0.63	0	3.66	8.3
4.45	17.88	2.19	0.46	0	2.94	5.59
4.55	17.78	2.1	0.43	0	2.57	5.09
4.75	17.7	1.61	0.49	0	2.99	5.09
4.94	17.6	1.53	0.48	0	2.67	4.68
5.08	17.51	0.39	0.57	0	2.6	3.56
5.18	17.52	0.78	0.57	0	2.8	4.15
5.39	17.53	0.43	0.54	0	2.61	3.59
5.72	17.36	0.95	0.33	0	2.13	3.41
6.06	17.25	0.69	0.05	0	2.53	3.26
6.35	17.18	0	0	0.52	2.01	2.53
6.49	17.19	0.02	0	0.35	2.22	2.6
6.69	17.18	0	0	0.63	2.14	2.76
6.88	17.14	0.05	0	0.67	2.23	2.95
7.11	17.1	0	0	0.92	1.82	2.74
7.4	17.02	0	0	0.75	1.9	2.65
7.68	16.97	0	0	0.26	2.08	2.34

Estación 2 - Marzo 2015						
Profundiad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total
m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.28	19.84	62.95	0	1.58	3.07	67.6

0.52	19.84	58.61	0	0	4.93	63.54
0.89	19.85	60.31	0	0	3.25	63.57
0.94	19.85	62.65	0	0	3.86	66.51
0.97	19.86	61.51	0	2.38	3.32	67.21
1.2	19.85	56.63	0.18	2.79	2.96	62.55
1.42	19.83	53.45	0.39	1.11	3.64	58.59
1.66	19.77	51.41	0	1.66	2.28	55.35
2.1	19.64	47.72	0.09	0.73	1.9	50.44
2.54	19.47	43.74	0	0.49	1.98	46.22
2.85	19.35	40.99	0.17	1.17	1.56	43.9
3.17	19.29	39.08	0.16	0.32	2.06	41.62
3.41	19.23	37.98	0.13	0.71	1.51	40.33
3.46	19.23	39.87	0.4	0	1.55	41.82
3.48	19.24	38.91	0.33	0	1.44	40.68
3.6	19.25	39.04	0.2	0.72	1.11	41.07
3.69	19.27	39.37	0.49	0	1.53	41.38
3.77	19.27	38.95	0.08	1.18	1.18	41.39
4.03	19.24	36.35	0.04	0.95	1.44	38.77
4.12	19.21	36.43	0.25	0.29	1.51	38.48
4.29	19.18	34.46	0.12	0.66	1.38	36.62
4.39	19.17	33.11	0.2	1.23	1.07	35.61
4.42	19.16	33.99	0.28	0.36	1.49	36.12
4.42	19.18	34.85	0	0.35	1.64	36.83
4.48	19.18	34.72	0.38	0.72	1.15	36.98
4.64	19.18	34.69	0.18	0.67	1.32	36.86
4.74	19.14	30.1	0.14	0.57	1.32	32.13
4.79	19.12	29.29	0.18	0.56	1.32	31.35
4.81	19.1	29.53	0.32	1.25	1.06	32.16
4.97	19.05	28.81	0.34	1.05	1.11	31.31
4.99	19.03	29.76	0	0.56	1.45	31.77
5.04	19.06	28.2	0.19	0.78	1.24	30.41
5.26	18.94	23.43	0.42	0.96	1.02	25.83
5.32	18.84	22.6	0.12	0.52	1.22	24.46
5.38	18.87	24.54	0.29	0.82	1.17	26.81
5.39	18.92	26.08	0.36	0.83	1.2	28.47
5.49	18.92	26.41	0.11	0.52	1.5	28.54
5.64	18.9	22	0.76	1.52	0.4	24.68
5.66	18.89	20.14	0.28	0.54	0.9	21.87
5.67	18.91	21.87	0.38	1.46	0.59	24.3
5.84	18.86	17.82	0.23	0.91	0.81	19.77
6.11	18.64	9.5	0.34	1.02	0.21	11.06

6.3	18.45	7.49	0.18	0.62	0.51	8.79
6.35	18.39	7.29	0.27	0.98	0.18	8.73
6.37	18.39	7.73	0.16	0.45	0.51	8.86
6.38	18.42	8.03	0.19	0.63	0.37	9.21
6.52	18.39	7.48	0.11	0.45	0.44	8.47
6.96	18.23	6.37	0.1	0.52	0.42	7.41
6.98	18.16	6.13	0.17	0.7	0.28	7.28
7.01	18.18	6.58	0.15	0.58	0.32	7.63
7	18.22	6.87	0.17	0.63	0.33	8
6.99	18.26	6.71	0.11	0.4	0.45	7.68
7.05	18.26	7.09	0.13	0.51	0.42	8.15
7.11	18.23	6.89	0.2	0.8	0.23	8.12
7.59	18.13	5.3	0.22	0.89	0.19	6.6
7.82	17.98	4.28	0.16	0.57	0.28	5.29
7.95	17.92	4.34	0.3	0.84	0.02	5.5
8.12	17.92	4.41	0.17	0.64	0.26	5.48
8.16	17.94	4.36	0.17	0.65	0.27	5.46
8.18	17.99	4	0.16	0.63	0.24	5.03
8.22	18.03	4.35	0.1	0.46	0.35	5.25
8.32	18.03	4.15	0.48	0.93	0	5.56
8.43	17.97	4.03	0.18	0.64	0.21	5.06
8.53	17.94	3.74	0.32	0.74	0.11	4.91
8.54	17.97	3.33	0.4	0.76	0.05	4.54
8.53	17.99	4.06	0.23	0.35	0.25	4.88
8.55	18.03	4.34	0.24	0.34	0.27	5.19
8.53	18.05	3.95	0.32	0.73	0.08	5.08
8.54	18.05	3.78	0.22	0.78	0.12	4.9
8.52	18.04	4.09	0.37	0.65	0.16	5.27
8.53	18.03	3.57	0.34	0.87	0.06	4.85
8.62	17.99	3.75	0.28	0.7	0.12	4.84
8.64	17.92	3.56	0.25	0.85	0.09	4.75
8.65	17.96	4.09	0.35	0.71	0.07	5.23
8.67	18	3.88	0.26	0.71	0.16	5.01
8.71	18.03	3.51	0.57	1.11	0.02	5.21
8.73	18.05	2.85	0.71	1.96	0	5.52

Estación 2 - Abril 2015						
Profundidad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total
m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.23	20.1	38.99	0	0	7.95	46.93
0.7	20.14	52.31	0	0	7.38	59.69

0.89	20.15	52.75	0	0	10.14	62.89
1.24	20.16	55.63	0	0	10.06	65.68
1.47	20.14	52.19	0	0	9.2	61.39
1.68	20.12	45.22	0	0	13.36	58.58
2.35	20.08	49.2	0	0	12.04	61.23
2.74	20.06	47	0	0	11.78	58.78
3.09	20.03	46.05	0	0	12.56	58.61
3.49	19.99	43.07	0	0	12.78	55.85
3.86	19.98	39.37	0	0	12.56	51.93
4.23	19.94	39.83	0	0	12.28	52.1
4.73	19.85	45.91	0	0	11.46	57.37
5.13	19.58	35.25	0	0	14.04	49.3
5.37	19.26	32.64	0	0	14.59	47.23
5.56	19.1	28.86	0	0	13.4	42.26
5.95	18.92	14.37	0	0	12.73	27.1
6.68	18.57	2.43	0	0	8.61	11.05
7.09	18.22	0	0	0	5.92	5.92
7.59	17.97	0	0	0	5.14	5.14
8.05	17.79	0	0	0	3.46	3.46
8.56	17.65	0	0.07	0	3.2	3.27
9.14	17.53	0	0.09	0	2.79	2.88
9.49	17.44	0	0.05	0	2.57	2.62
10.1	17.36	0	0.49	0	2.01	2.5
10.63	17.24	0	0	0	2.5	2.5
11.1	17.15	0	0	0	2.35	2.35
11.62	17.1	0	0.02	0	2.14	2.16
12.24	17.04	0	0.72	0	1.64	2.35
12.78	16.96	0	0.17	0	2.28	2.45
13.18	16.92	0	0.24	0	2.35	2.59
13.7	16.92	0	0.37	0	2.18	2.54
14.2	16.85	0	0.51	0	2.07	2.58
14.58	16.78	0	0.34	0	2.38	2.72
15.18	16.72	0	0.33	0	2.13	2.46
15.57	16.69	0	1.21	0	1.22	2.43
16.16	16.66	0	0.95	0	1.53	2.47
16.72	16.61	0	1.31	0	1.38	2.7
17.28	16.55	0	1.01	0	1.59	2.6
17.68	16.51	0	1.01	0	1.73	2.74
18.19	16.48	0	1.23	0	0.9	2.13
18.67	16.45	0	1.34	0	1.06	2.4
19.27	16.41	0	1.82	0	0.12	1.93

19.71	16.38	0	1.19	0	0.67	1.86
20.26	16.36	0	1.1	0	0.89	2
20.78	16.35	0	0.98	0	1.19	2.17
21.16	16.34	0	0.63	0	1.44	2.07
21.55	16.31	0	1.06	0	0.53	1.59
21.99	16.3	0	1.32	0	0.2	1.52
22.73	16.27	0	1.16	0	0.37	1.53
23.06	16.27	0	1.1	0	0.36	1.45
23.52	16.28	0	0.47	0	1.15	1.62
24.1	16.26	0	0	0	1.6	1.6
24.6	16.24	0	0.21	0	1.44	1.65
25.03	16.24	0	0	0.45	1.51	1.97
25.52	16.22	0	0.29	0	1.24	1.53
26.09	16.19	0	0.48	0	1.01	1.49
26.38	16.2	0	0.14	0	1.3	1.44
26.79	16.2	0	0	0.94	1.4	2.34

Estación 2 - Mayo 2015						
Profundiad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total
m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.42	20.16	22.24	0	2.7	10.99	35.93
0.58	20.16	23.73	0	0	12.79	36.51
0.73	20.17	30.48	0	0	9.44	39.92
0.87	20.15	26.57	0	0	10.58	37.15
1.18	20.22	29.23	0	0	10.96	40.19
1.39	20.28	25.95	0	2.84	10.03	38.82
1.55	20.29	33.04	0	0	9.5	42.54
1.81	20.26	30.1	0	0	14.79	44.9
2	20.29	38.35	0	0	14.11	52.46
2.27	20.28	42.24	0	0	15.29	57.54
2.43	20.25	41.23	0	0	16.17	57.41
2.63	20.23	46.41	0	0	15.93	62.34
2.82	20.19	44.41	0	0	15.48	59.88
3	20.15	42.2	0	0	15.27	57.47
3.21	20.1	42.13	0	0	16.61	58.74
3.27	20.07	38.55	0	0	16.38	54.92
3.4	20.05	36.1	0.4	0	18.8	55.31
3.47	20.04	28.33	0	0	21.08	49.41
3.52	20.02	32.25	0	0	21.97	54.22
3.6	20.02	34.58	0	0	22	56.57
3.68	20.02	27.77	0	0	22.69	50.47

3.73	19.99	21.01	0	0	22.99	43.99
3.78	19.98	23.61	0	0	20.74	44.35
3.9	19.99	25.62	0	0	22.74	48.36
3.99	19.97	19.8	0.29	0	25	45.09
4.04	19.96	23.35	0	0	21.45	44.8
4.15	19.92	17.62	0	0	20.62	38.25
4.29	19.86	11.85	0	0	19.78	31.62
4.45	19.83	13.89	0	0	20.54	34.43
4.63	19.8	21.07	0	0	19.5	40.57
4.78	19.78	13.61	0	0	23.04	36.65
4.92	19.73	17	0	0	24.49	41.49
5.14	19.62	16.36	0	0	23.32	39.68
5.37	19.49	10.56	0	0	27.2	37.75
5.52	19.39	5.08	0	0	27.58	32.66
5.79	19.32	14.23	0	0	22.54	36.78
5.9	19.2	17.77	0	0	21.11	38.88
6.12	19.07	14.24	0	0	20.39	34.63
6.36	18.91	8.49	0	0	17.61	26.1
6.53	18.75	0	0	0	16.85	16.85
6.81	18.52	0	0	0	11.32	11.32
7.01	18.33	0	0	0	10.69	10.69
7.22	18.19	0	1.43	0	7.78	9.2
7.43	18.06	0	4.63	0	5.91	10.53
7.69	17.85	0	2.48	0	6.3	8.78
7.85	17.71	0	1.65	0	4.01	5.67
8.07	17.68	0	2.19	0	2.53	4.71
8.29	17.63	0	2.46	0	1.64	4.1
8.57	17.53	0	2.31	0	1.67	3.99
8.83	17.47	0	1.99	0	1.52	3.51
8.98	17.44	0	1.6	0	1.26	2.86
9.27	17.4	0	1.08	0	2.06	3.15
9.54	17.32	0	1.42	0	1.55	2.97
9.78	17.28	0	1.92	0	0.8	2.72
10.04	17.23	0	1.84	0	0.86	2.69
10.29	17.19	0	2.28	0	1.18	3.46
10.51	17.17	0	2.45	0	0.43	2.88
10.76	17.12	0	2.45	0	0.51	2.96
10.98	17.08	0	2.42	0	0.02	2.43
11.34	17.04	0	1.8	0	1.12	2.92
11.59	16.99	0	2.81	0	0	2.81
11.86	16.92	0	2.03	0	0.42	2.44

12.17	16.88	0	1.94	0	0.64	2.58
12.41	16.85	0	1.98	0	0.11	2.09
12.8	16.81	0	1.89	0	0	1.89
12.99	16.8	0	2.11	0	0	2.11
13.21	16.77	0	2.36	0	0	2.36
13.57	16.72	0	2.23	0	0	2.23
13.92	16.7	0	2.23	0	0	2.23
14.31	16.67	0	2.45	0	0	2.45
14.55	16.65	0	2.51	0	0	2.51
14.92	16.62	0	2.82	0	0	2.82
15.11	16.62	0	2.31	0	0.59	2.9
15.38	16.62	0	1.51	0	2.99	4.5
15.66	16.58	0	3.25	0	0.51	3.76
15.95	16.52	0	2.07	0	1.48	3.56
16.4	16.48	0	3.04	0	0	3.04
16.94	16.45	0	3.15	0	0	3.15
17.33	16.39	0	2.99	0	0	2.99
17.9	16.37	0	2.64	0	2.01	4.66
18.2	16.35	0	3.77	0	0.03	3.8
18.25	16.35	0	1.92	0	2.94	4.86
18.27	16.39	0	0.66	0	12.14	12.8

Estación 3 - Diciembre 2014						
Profundiad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total
m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.16	19.2	0	5.12	0	29.51	34.63
0.2	19.19	2.8	3.7	0	27.86	34.36
0.37	19.18	1.87	7.95	0	28.34	38.15
0.59	19.1	0	5.71	0	26.27	31.98
0.73	19.08	0	7.2	0	23.48	30.69
0.87	19.05	0	6.3	0	22.08	28.38
1.05	19.03	0	9.24	0	20.34	29.59
1.21	19.01	0	5.88	0	19.53	25.41
1.44	19.01	0	8.81	0	17.27	26.08
1.59	18.98	0	8.35	0	18.1	26.45
1.88	18.84	0	8.98	0	16.09	25.07
2.08	18.62	0	5.94	0	15.66	21.6
2.36	18.51	0	3.34	0	16.35	19.7
2.5	18.4	0	2.02	0	14.38	16.4
2.65	18.34	0	3.47	0	14.14	17.61
2.79	18.34	0	2.69	0	14.56	17.25

3.03	18.22	0	3.29	0	12.6	15.89
3.32	18.08	0	2.72	0	11.5	14.21
3.62	17.98	0	2.34	0	11.37	13.71
3.96	17.8	0	2.76	0	9.61	12.37
4.22	17.64	0	2.85	0	8.98	11.83
4.52	17.5	0	2.12	0	8.07	10.19
4.66	17.38	0	3.05	0	8.66	11.71
4.9	17.31	0	2.35	0	7.09	9.44
5.12	17.19	0	2.24	0	6.9	9.14
5.38	17.08	0	1.97	0	6.31	8.27
5.56	17.02	0	2.08	0	5.11	7.19
5.78	17.01	0	3.17	0	4.47	7.64
5.96	16.96	0	2.73	0	4.89	7.62
6.21	16.94	0	2.36	0	4.92	7.29
6.41	16.93	0	2.8	0	4.39	7.19
6.58	16.92	0	3.32	0	4.94	8.25
6.73	16.91	0	3.04	0	4.06	7.1
6.85	16.9	0	3.66	0	5.51	9.16
7.04	16.88	0	4.11	0	3.89	8
7.21	16.85	0	2.79	0	4.59	7.38
7.43	16.85	0	3.2	0	4.2	7.39
7.58	16.83	0	3.9	0	3.95	7.86
7.86	16.75	0	2.64	0	4.08	6.72
7.97	16.69	0	2.3	0	3.92	6.21

Estación 3 - Marzo 2015						
Profundiad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total
m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.1	19.74	0	0	0	0	0
0.26	19.75	0	0	0	0	0
0.35	19.75	1.4	0	0	0	1.4
0.56	19.75	14.2	1.89	0	0.29	16.38
0.72	19.75	23.58	2.69	0	0	26.28
1.13	19.67	25.7	3.13	5.05	0	33.88
1.28	19.62	29.96	2.12	0.61	2.89	35.58
1.5	19.59	41.53	0.73	3.74	0	46.01
1.66	19.49	37.14	0	0	5.07	42.21
1.77	19.47	39.87	0.26	0	4.97	45.1
2.3	19.37	34.91	0.84	5.22	2.91	43.87
2.56	19.13	37.4	0.64	0	3.22	41.26
2.67	19.02	35.8	0.99	3.94	2.55	43.29

2.88	18.97	38.39	1.02	0	3.24	42.65
3.12	18.93	29.9	0.93	2.64	2.09	35.56
3.32	18.7	25.53	0.12	0.21	2.34	28.2
3.78	18.54	22.18	0.18	0.49	1.79	24.64
4.15	18.4	18.11	0.59	1.87	0.81	21.39
4.29	18.32	16.56	0.32	1.24	1.17	19.29
4.44	18.31	16.95	0.52	0.65	1.45	19.57
4.91	18.24	15.76	0.65	1.47	0.9	18.78
5.17	18.21	15.03	0.72	0.98	1.12	17.84
5.71	18.18	14.66	0.81	1.62	0.84	17.93
6.03	18.15	14.33	0.71	1.86	0.73	17.62
6.29	18.1	14.9	1.02	1.51	0.92	18.36
6.57	18	14.37	0.84	1.84	0.59	17.63
6.98	17.88	14.72	0.9	1.76	0.75	18.13
7.1	17.8	15.7	0.87	1.57	0.85	18.98
7.43	17.78	15.84	1.25	1.78	0.56	19.42
8.07	17.71	15.3	1	1.78	0.73	18.82
8.6	17.65	17.17	1.14	1.55	0.77	20.63
8.96	17.61	17.13	1.04	1.57	0.54	20.28
9.47	17.58	17.29	1.1	2.24	0.39	21.03
9.65	17.55	18.13	0.88	1.35	0.82	21.18
9.67	17.54	18.25	1.11	1.07	0.76	21.2
9.94	17.54	17.82	1.04	1.42	0.61	20.88
10.27	17.5	18.88	1.21	1.13	0.85	22.07
10.42	17.45	19.59	0.85	1.39	0.81	22.64
10.58	17.47	20.57	1.22	1.24	0.65	23.67
10.99	17.4	16.94	0.89	1.63	0.64	20.1
11.14	17.37	19.89	0.87	0	1.46	22.23
11.31	17.37	18.71	1.21	2.38	0.3	22.61
11.34	17.38	20.83	1.16	1.08	0.88	23.95
11.51	17.36	18.44	0.98	1.34	0.56	21.33
11.91	17.31	18.17	0.85	1.62	0.8	21.44
12.17	17.29	19.23	1.17	1.85	0.53	22.78
12.21	17.31	19.26	1.1	0.57	1.18	22.1
12.31	17.34	20.33	1.05	1.34	0.62	23.34
12.65	17.29	17.15	0.93	1.38	0.78	20.24
13.53	17.21	16.25	1	1.83	0.64	19.72
14.25	17.13	16.61	1.02	1.78	0.52	19.93
14.77	17.07	15.09	0.72	1.68	0.75	18.25
15.2	17.03	14.24	0.85	1.73	0.33	17.16
15.6	16.99	15.35	0.78	1.56	0.46	18.14

16.1	16.94	15	1.01	1.85	0.21	18.07
16.35	16.9	14.59	0.72	1.12	0.64	17.07
16.85	16.88	13.28	0.68	1.55	0.34	15.85
17.47	16.79	12.08	0.69	1.41	0.36	14.54
18.25	16.68	10.11	0.95	1.54	0.22	12.82
18.93	16.55	7.74	1.08	0.72	0.48	10.03
19.58	16.48	5.03	0.83	1.15	0.01	7.01
20.16	16.39	3.64	0.68	0.88	0	5.21
20.71	16.36	3.09	0.61	0.71	0.02	4.43
21.37	16.31	2.28	0.34	0.58	0.1	3.31
21.72	16.29	1.92	0.32	0.59	0	2.83
21.79	16.29	1.93	0.18	0.35	0.15	2.62

Estación 3 - Abril 2015						
Profundiad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total
m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.23	18.26	0	5.76	0	41.39	47.15
0.24	18.24	0	8.19	0	39.14	47.33
0.25	18.4	0	7.35	0	38.85	46.2
0.6	18.73	0	6.42	0	41.19	47.61
0.96	18.94	0	6.85	0	41.89	48.74
1.24	19.07	0	5.99	0	35.62	41.61
1.41	19.11	0	7.7	0	35.38	43.07
1.59	19.14	0	3.92	0	38.2	42.12
1.86	19.15	0	5.22	0	32.53	37.75
2.06	19.15	0	7.59	0	28.21	35.8
2.35	19.16	0	7.79	0	27.48	35.27
2.59	19.15	0	7.63	0	24.91	32.54
2.76	19.14	0	7.17	0	25.04	32.21
3.05	19.16	0	7.42	0	20.66	28.08
3.19	19.15	0	6.64	0	18.88	25.52
3.43	19.13	0	7.24	0	15.37	22.61
3.61	19.07	0	8.8	0	11.78	20.58
3.85	18.93	0	7.16	0	11.15	18.31
4.11	18.72	0	6.27	0	7.8	14.07
4.19	18.58	0	5.61	0	10.34	15.95
4.52	18.51	0	3.8	0	8.12	11.92
4.81	18.34	0	3.85	0	4.7	8.55
4.92	18.19	0	4.75	0	2.35	7.11
5.05	18.12	0	4.73	0	2.64	7.37
5.15	18.08	0	4.51	0	2.93	7.44

5.46	18.03	0	4.38	0	2.94	7.32
5.79	17.95	0	4.69	0	1.83	6.52
6.1	17.82	0	5.21	0	1.84	7.06
6.42	17.71	0	4.81	0	1.86	6.67
6.76	17.58	0	4.47	0	1.96	6.44
7.13	17.48	0	4.9	0	0.79	5.7
7.47	17.4	0	4.94	0	0.24	5.19
7.7	17.36	0	4.94	0	0.23	5.17
8.06	17.3	0	4.97	0	0.23	5.2
8.31	17.26	0	4.74	0	0.44	5.18
8.7	17.24	0	4.37	0	0.37	4.74
9.08	17.21	0	4.18	0	0	4.18
9.51	17.19	0	4.14	0	0	4.14
9.66	17.14	0	3.92	0	0	3.92
9.95	17.12	0	3.68	0	0	3.68
10.26	17.08	0	3.28	0	0	3.28
10.41	17.03	0	3.36	0	0	3.36
11.04	16.99	0	3.23	0	0	3.23
11.24	16.95	0	3.14	0	0	3.14
11.59	16.92	0	2.92	0	0	2.92
11.95	16.87	0	2.65	0	0	2.65
12.3	16.79	0	2.48	0	0	2.48
12.72	16.74	0	2.97	0	0	2.97
12.98	16.72	0	2.57	0	0	2.57
13.55	16.68	0	3	0	0	3
14.09	16.65	0	2.68	0	0	2.68
14.46	16.63	0	2.8	0	0	2.8
14.8	16.61	0	2.83	0	0	2.83
15.26	16.57	0	2.92	0	0	2.92
15.67	16.53	0	2.86	0	0	2.86
16.16	16.49	0	2.94	0	0	2.94
16.74	16.45	0	2.9	0	0	2.9
17.29	16.41	0	1.96	0	0.67	2.63
17.87	16.38	0	2.66	0	0	2.66
18.47	16.35	0	2.62	0	0.04	2.67

Estación 3 - Mayo 2015						
Profundiad	Temperatura	Algas Verdes	Cianobacterias	Diatomeas	Cryptofitas	Clorofila total
m	°C	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
0.16	20.1	25.88	0	0	10.39	36.27
0.49	20.12	26.73	0	0	9.15	35.88

1.01	20.1	33.01	0	0	8.98	41.99
1.69	19.94	40.95	0	0	10.8	51.75
2.28	19.71	42.54	0	0	9.61	52.15
2.72	19.58	41.21	0	0	8.91	50.12
3.43	19.45	36.37	0	0	8.27	44.64
3.82	19.23	26.53	0	0	6.16	32.68
4.02	19.19	31.89	0	0	7.45	39.34
4.4	19.21	25.13	0	0	4.77	29.89
4.79	18.97	16.16	0	0	4.76	20.92
5.13	18.67	13.43	0	0	6.19	19.62
5.52	18.53	12.33	0	0	4.92	17.26
6.01	18.39	14.18	0.35	0	3.73	18.27
6.29	18.32	15.42	0.46	0	2.79	18.67
6.5	18.3	15.72	0.5	0	2.77	18.99
6.9	18.25	15.34	0.12	0	4.23	19.68
7.35	18.17	13.89	0	0	4.94	18.82
7.65	18.09	14.19	0	0	4.67	18.86
7.99	18.01	13.3	0	0	4.34	17.64
8.54	17.88	11.53	0.16	0	4.3	15.99
9.18	17.73	10.49	0.11	0	4.3	14.9
9.3	17.61	11.95	0.1	0	3.89	15.95
9.57	17.58	12.54	0.15	0	3.49	16.18
9.94	17.52	10.43	0.11	0	3.03	13.57
10.37	17.47	10.81	0	0	3.52	14.33
11.04	17.37	9.84	0.06	0	3.25	13.15
11.6	17.26	8.27	0.09	0	3.2	11.56
11.91	17.17	7.22	0.14	0	3.2	10.56
12.43	17.1	4.74	0	0	2.75	7.48
13.01	17	2.39	0	0	2.51	4.9
13.8	16.91	1.04	0	0	2.29	3.32
14.35	16.84	1.08	0	0	2.25	3.33
15.03	16.77	1.04	0	0	2.23	3.27