

Hipótesis: la agrupación *Microcystis aeruginosa* Kütz.-*Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm.-bacterias en la laguna Alalay, Cochabamba, Bolivia es de tipo simbiótico

Hypothesis: the union *Microcystis aeruginosa* Kütz.-*Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm.-bacteria in Alalay Pond, Cochabamba, Bolivia is symbiotic

Eduardo A. Morales¹, Sinziana F. Rivera¹, Carlos E. Wetzel², Paul B. Hamilton³,
Denise C. Bicudo⁴, Ricardo Amils Pibernat⁵ & Luc Ector²

¹Herbario Criptogámico, Universidad Católica Boliviana San Pablo, Calle M. Márquez esq. Plaza Jorge Trigo s/n, P.O. Box 5381, Cochabamba, Bolivia

²Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), Environmental Research and Innovation Department (ERIN), 41 rue du Brill, L-4422 Belvaux, Grand-duchy of Luxembourg

³Research and Collection Division, Canadian Museum of Nature, P.O. Box 3443, Station D, Ottawa, Ontario K1P 6P4, Canada

⁴Instituto de Botánica, Departamento de Ecología, Av. Miguel Stéfano 3687, 04301-902 São Paulo, Brasil

⁵Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid 28049, España

Resumen: Se reporta una floración de *Microcystis aeruginosa* Kütz. en el plancton de la laguna Alalay, un ecosistema salobre urbano, altamente eutrófico. Las colonias de la cianobacteria estaban a su vez colonizadas por la diatomea *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm., una co-ocurrencia que ha sido reportada anteriormente solo dos veces en la literatura. Como parte de la agrupación también se observaron bacterias pleomorfas cuya identidad no se ha establecido. Observaciones de campo y laboratorio, así como una revisión bibliográfica extensa, sugieren que la unión de los tres tipos de organismos es simbiótica, asegurando un suministro constante de nutrientes de origen exógeno y endógeno. *Nitzschia palea*, además de obtener nutrientes, también se beneficia al mantenerse suspendida en la parte superior de la zona fótica donde la disponibilidad de luz y nutrientes es mayor. En este manuscrito se exploran diversos argumentos para dar sustento a la hipótesis de la simbiosis, como un primer paso hacia la investigación fisiológica y molecular de la asociación.

Palabras clave: Bacillariophyta, Cianobacterias, contaminación, eutrofia, laguna urbana, plancton, Sphingomonadales

Abstract: A bloom of *Microcystis aeruginosa* Kütz. is reported from the plankton of Alalay Pond, a brackish, urban and highly eutrophic ecosystem. The cyanobacterial colonies were in turn colonized by the diatom *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. This co-occurrence has been previously reported only twice in the literature. As part of the grouping, pleomorphic bacteria were also observed, but their identity could not be established. Field and laboratory observations, as well as a literature revision, suggest that the association of the three types of organisms is symbiotic, assuring a continuous supply of nutrients of exogenous and endogenous origin. Besides obtaining nutrients, *Nitzschia palea* also benefits from suspension in the upper part of the photic zone, where availability of light and nutrients is higher. In this manuscript, diverse arguments to support the symbiosis hypothesis are explored as a first step towards the physiological and molecular investigation of the association.

Keywords: Bacillariophyta, contamination, Cyanobacteria, eutrophy, plankton, Sphingomonadales, urban pond

1 Introducción

Las relaciones simbióticas establecidas por las diatomeas con otros organismos son conocidas (p.e., Geitler [31], Reimer & Lee [69], Brehm *et al.* [9], Janson [40], Lakatos *et al.* [50]). Sin embargo, el caso específico de agrupaciones entre especies del género *Nitzschia* Hassall con cianobacterias se conoce menos. En particular, la co-ocurrencia *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm.-*Microcystis aeruginosa* Kütz. ha sido reportada solo dos veces en la literatura [32][27] y las implicaciones de tal unión para ambos microorganismos no han sido exploradas.

Las cianobacterias son conocidas por su capacidad de establecer asociaciones con una gran diversidad de organismos sean estos autótrofos o heterótrofos [68]. La sugerencia de una asociación de tipo simbiótico entre *Microcystis* y *Nitzschia*, implicaría que ambas algas se beneficien desde un punto de vista físico (protección, mecanismo de suspensión para el epífito, etc.) y químico a través de un intercambio activo de sustancias. Tal intercambio químico no ha sido comprobado para el caso específico del par *M. aeruginosa*-*Nitzschia palea* [32][27], pero la elaboración de una hipótesis en este sentido puede ser corroborada por los numerosos estudios de otras simbiosis entre cianobacterias y diatomeas, por lo que se conoce hasta ahora de la fisiología y requerimientos autecológicos de ambos organismos y por lo que se conoce de la ecología de ambientes eutróficos donde se producen tales agrupaciones. En el presente manuscrito intentamos formular tal hipótesis como guía de trabajo futuro.

Se reporta aquí una floración de *M. aeruginosa* que se halló durante muestreos del plancton de la laguna Alalay, Cochabamba, Bolivia en abril, 2013. Las colonias

mucilaginosas de *Microcystis* estaban a su vez colonizadas por una diatomea nitzschioide y bacterias. Se exploran las posibles relaciones ecológicas y nutricionales entre los tres tipos de organismos a fin de poder explicar su co-ocurrencia y las ventajas de su posible asociación.

2 Metodología

La laguna Alalay, ubicada en la ciudad de Cochabamba (17° 23' 43" S, 66° 09' 35" O), es un cuerpo de agua somero (de 0,5-3 m de profundidad), tiene una extensión de 230 ha y está a una altitud de 2.560 m s.n.m. Es la laguna más grande del Valle Seco Interandino Sudamericano, caracterizado por una época cálida y lluviosa (de Octubre a Abril; temperaturas medias 12 a 24° C) y otra fría y seca (de Mayo a Septiembre; temperaturas medias de 5 a 24° C). Topográficamente, la ecoregión presenta altitudes que oscilan entre 1.200-3.500 m s.n.m. y está flanqueada por laderas escarpadas y áreas de sedimentación aluvial de numerosos ríos intermitentes alimentados por aguas de montaña superficiales y subterráneas [55][60].

La vegetación actual de la laguna está compuesta principalmente por macrófitas emergentes (*Schoenoplectus californicus* subsp. *tatora* (Kunth) T. Koyama y *Typha dominguensis* Pers.), sumergidas (*Myriophyllum verticillatum* L. y *Potamogeton pectinatus* L.) y flotantes (*Azolla filiculoides* Lam. y *Pistia stratiotes* L.) [3][14][19][59]. Estas macrófitas y algas como *Rhizoclonium* sp., diatomeas, euglenoides y *Microcystis aeruginosa* producen floraciones sucesivas o asociadas durante todo el año [58][59].

Desde los 1980s, la laguna ha presentado un estado eutrófico y contaminado debido a descargas domésticas, de fábricas de plásticos y ropa, así como a escorrentía cargada de desechos orgánicos [86]. La laguna también recibe grandes descargas de nutrientes, materia orgánica, desechos industriales de curtiembres, metales pesados y aguas de lavaderos de automóviles [2][55][65]. La laguna es salina debido a la roca madre de tipo sedimentario y rica en carbonatos y tiene elevadas concentraciones de nutrientes, especialmente fósforo y sulfatos, y cloruros los cuales probablemente provienen del material contaminante que ingresa a la laguna. El contenido de nitrógeno es bajo en todas las épocas del año y esto se ha atribuido a un rápido secuestro por parte de la macrofitia [2][14].

El 15 de abril, 2013, se realizó el muestreo de plancton con una red de 20 µm de porosidad en varios puntos de la laguna (N, NE, E, SE, S, SO, O y NO). Las muestras de 100 ml fueron inmediatamente fijadas con 10 gotas de formol al 40% para arrestar el crecimiento algal y la actividad zooplanctónica. Las fotografías de campo se tomaron con una cámara Sony Cyber-shot HD AVCHD Progressive con un lente Sony Lens G de 20X de aproximación. Un día después de la colecta se realizaron observaciones y conteos al microscopio de luz en preparaciones húmedas

utilizando un microscopio Zeiss Universal equipado con una cámara digital a color Jenoptik ProgRes CF y el software ProGres CapturePro ver. 2.8, a aumentos entre 125X y 1250X. Para los conteos, se preparó una submuestra para cada sitio y se tomaron en cuenta 10 campos al azar en los que solo se contaron células de *Microcystis* y de *Nitzschia*. Las células bacterianas fueron difíciles de visualizar a los aumentos utilizados y otro tipo de técnicas son necesarias para su conteo.

Para el examen y fotografiado de *Nitzschia* a 1250X, porciones de las muestras fueron oxidadas mediante ebullición por 20 min con ácido nítrico en relación 2:1 con la muestra. Cada muestra se decantó con agua destilada varias veces hasta conseguir pH neutro. Alícuotas de las muestras se secaron a temperatura ambiente sobre cubreobjetos y se montaron permanentemente sobre portaobjetos con la resina sintética Naphrax®. Las figuras se montaron utilizando el programa Photoshop CS3®.

3 Resultados y Discusión

La laguna presentaba una floración conspicua de *Rhizoclonium* sp. casi en toda la extensión de la laguna (Fig. 1A) [59]. En zonas donde hay claros, se observan desarrollos de plancton, de coloración verdusca oscura. Las floraciones de *Microcystis* se distinguen porque forman una especie de líneas blanquecinas y una tenue telita sobre la superficie del agua (Fig. 1B).

Se hallaron colonias de *Microcystis* en todas las muestras de plancton, pero fueron más abundantes en las zonas SO, N, S y NO (en orden de importancia) (Tabla 1). La falta de uniformidad en la distribución de la cianobacteria se debe a la presencia de competidores, en su mayoría euglenoides (no identificados) que dominan o codominan el plancton. Tales euglenoides son más frecuentes en las zonas O, SE, E y NE (en orden de importancia). En todas las zonas se hallaron células de *Nitzschia* asociadas a *Microcystis*, a veces en claros de mucilago en medio de las colonias o a veces adheridas a la parte periférica de las mismas (Figs 1 D y E). La Tabla 1 muestra que existe una gran variabilidad en la proporción de células de la diatomea y la cianobacteria y esto se puede deber a factores tales como la forma irregular de las colonias de *Microcystis* (Fig. 1C) y efectos de las preparaciones húmedas al momento del análisis.

El análisis de microscopía de luz revela que el mucilago de *Microcystis* es persistente aún después de la oxidación ácida y que las diatomeas continúan asociadas a ese mucilago (Fig. 2A). De hecho, durante los conteos solo en 9 ocasiones se hallaron células de *Nitzschia* sueltas, lo que sugiere que la unión es mecánicamente estable. La serie de disminución de tamaño que aparece en las Figuras 2B-O muestra que la población se reproduce activamente, por lo menos asexualmente. No se hallaron evidencias de auxosporas.

Tabla 1: Resultados de los conteos de 10 campos al azar en cada muestra de plancton colectada en la Laguna Alalay, Cochabamba, Bolivia.

Sitio de muestreo	No. células <i>Nitzschia</i> /10 campos	No. células <i>Microcystis</i> /10 campos	Proporción <i>Nitzschia:Microcystis</i>
N	3	1.371	1 : 457
NE	5	75	1 : 15
E	1	140	1 : 140
SE	2	132	1 : 66
S	30	825	1 : 28
SO	49	2.109	1 : 43
O	5	402	1 : 80
NO	21	702	1 : 33

Las características de las valvas de la diatomea son muy similares a las de *Nitzschia palea* en el material tipo [80] y por ello se decidió utilizar este nombre para la población de Bolivia. Sin embargo, se deben constatar aún las características ultraestructurales para verificar esta identificación. Las investigaciones de microscopía electrónica están en progreso.

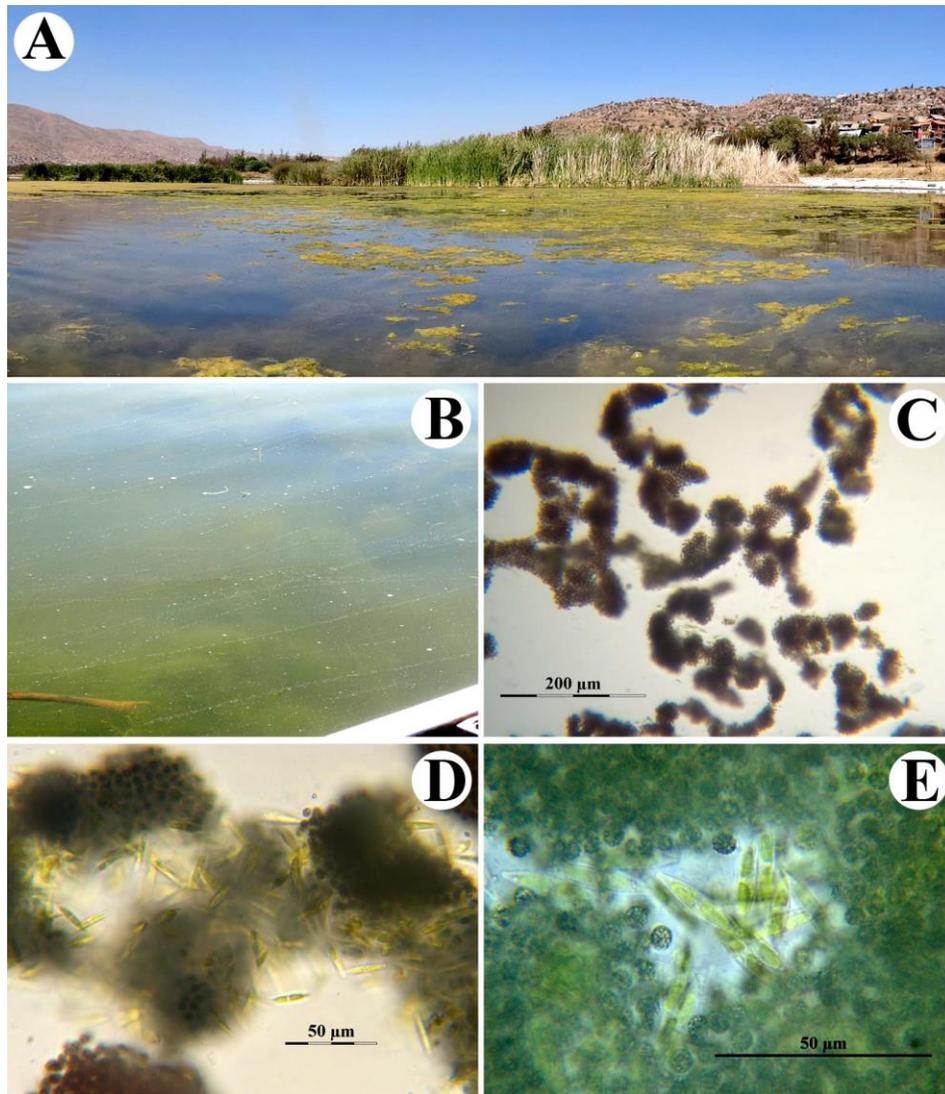


Figura 1: Floraciones de *Microcystis aeruginosa* en la laguna Alalay. **A.** Vista de la parte sudoeste de la laguna, uno de los sitios con mayor desarrollo de la cianobacteria. Nótese macrófitas emergentes (*Schoenoplectus californicus* subsp. *tatora* y *Typha dominguensis*). Los crecimientos verduzcos y pardos en el agua corresponden a *Rhizoclonium* sp. sobre *Potamogeton pectinatus*. **B.** Acercamiento sobre la floración de la cianobacteria. **C.** Colonias de *Microcystis aeruginosa* bajo microscopía de luz en preparaciones húmedas poco después de la colecta en campo. **D, E.** *Microcystis aeruginosa* y *Nitzschia palea* en unión íntima. Las bacterias se pueden observar como puntos translúcidos esparcidos por todas las colonias.

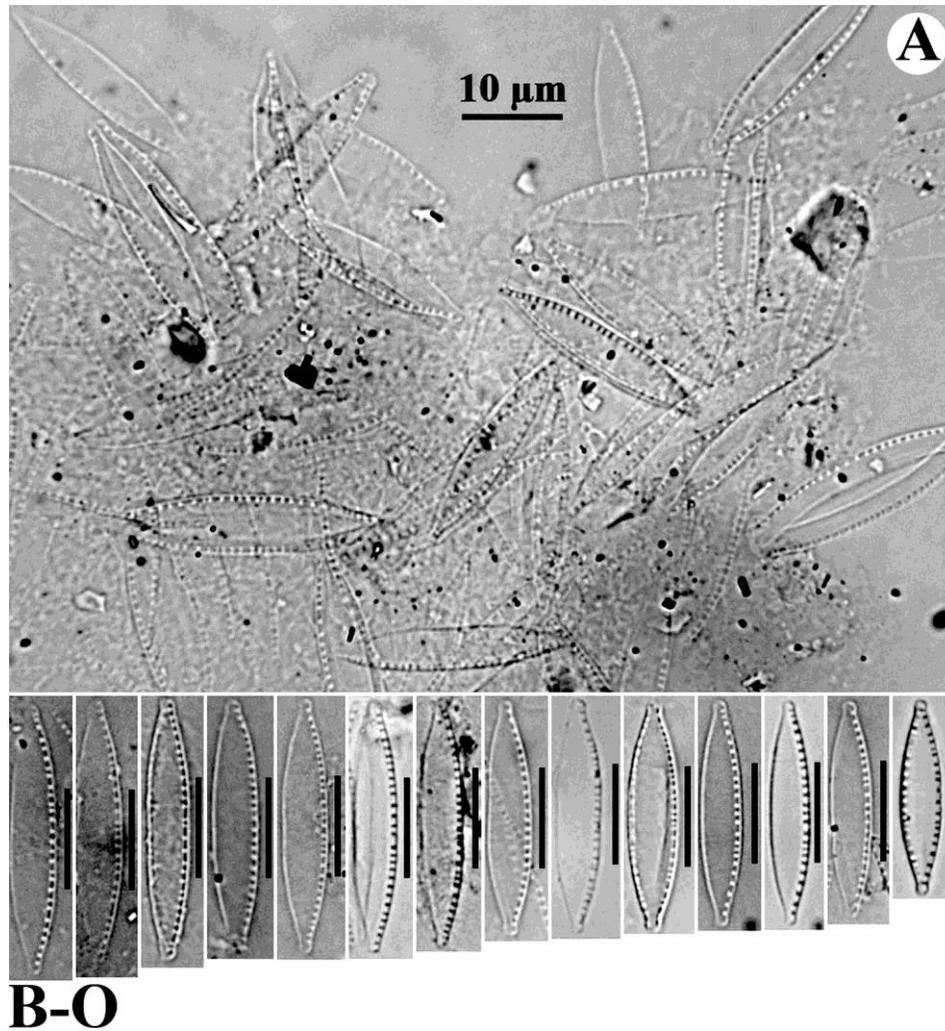


Figura 2: Microfotografías de valvas la epífita *Nitzschia palea* en placa permanente. **A.** Vista de un sector de la placa con varias valvas. Nótese la persistencia del mucílago de *Microcystis* y la unión de las células de *Nitzschia*. **B-O.** Serie de disminución de tamaño de la diatomea.

3.1 Construyendo la hipótesis: autoecología y nutrición de los componentes de la asociación

Tanto *M. aeruginosa* como *N. palea* son algas con crecimientos profusos en situaciones eutróficas. *Microcystis aeruginosa* frecuentemente produce floraciones masivas y persistentes [61][92], mientras que las floraciones de *N. palea* son más bien raras y de poca duración [4]. A pesar de que ambos microorganismos pueden encontrarse en el mismo hábitat planctónico de ecosistemas lénticos, reportes de uniones simbióticas entre ambas son extremadamente raros [27][32] y ello a pesar

de que las floraciones de *Microcystis* son tal vez las mejor documentadas a nivel mundial, especialmente por su capacidad de producir microcistinas, toxinas hepatotóxicas (causantes de disfunciones del hígado), inhibidoras de las fosfatasa proteicas (encargadas de procesos de defosforilación en proteínas permitiendo activación enzimática e interacción proteína-proteína) y causantes de pansteatitis (inflamación de la grasa corporal) [15][49][94]. Por tanto, es poco probable que la carencia de reportes en la literatura se deba a una omisión.

Microcystis aeruginosa tiene una alta plasticidad en cuanto a su fisiología, por lo que puede adaptarse rápidamente a cambios en concentraciones de nutrientes, luminosidad, disponibilidad de agua e inclusive presencia de otras bacterias en su medio [10][57][70][73][79]. Esta plasticidad fisiológica está posiblemente ligada a la plasticidad de su genoma, el cual contiene un número relativamente alto de genes atípicos en cianobacterias que podrían haber sido adquiridos por transferencia lateral [30].

La presencia de vesículas de gas en el citoplasma de *M. aeruginosa* hace que las colonias de ésta se mantengan en la superficie y formen las llamadas floraciones flotantes o superficiales, en contraposición con otro tipo de floraciones que son producidas por otras especies en estratos internos de la columna de agua [61]. La tolerancia a la radiación solar se debe a la concentración de los pigmentos fotosintéticos en el cromatoplasma, una capa múltiple de tilacoides localizada por debajo de la membrana celular y que actúa como “parasol” protegiendo al resto del citoplasma [38][62][89].

Las colonias de *Microcystis* son también capaces de cambiar de hábito planctónico a bentónico, presumiblemente debido a la reducción de vesículas de gas lo cual desencadena una acumulación masiva de su biomasa en sedimentos [12][24][66][96], donde también pueden ser enterradas y permanecer viables después de muchos años [7][70]. El cambio de compartimento dentro del cuerpo de agua se produce para mantener la cuota intracelular de fósforo mediante el paso del plancton, escaso en nutrientes al término de una floración, hacia el bentos donde existe una acumulación mayor de este nutriente [48]. Sin embargo, la reducción de vesículas de gas en el citoplasma cianobacteriano está también ligada a una reducción de la concentración de nitrógeno biológicamente disponible en la columna de agua ya que el nitrógeno es requerido para la elaboración de las proteínas constitutivas de las vesículas gaseosas [46][61][90].

Takamura *et al.* [78] resaltan la gran afinidad de ésta cianobacteria por el nitrógeno inorgánico disuelto (NID: amonio, nitratos y nitritos), absorbiéndolo poco tiempo después de su adición a una solución acuosa [6][51]. *Microcystis* no es diazotrófica (no fija nitrógeno gaseoso) debido a que no posee heterocitos ni el aparato bioquímico necesario para este proceso [5][25]. *Microcystis aeruginosa* también

utiliza fuentes de nitrógeno orgánico disuelto (NOD: úrea y algunos aminoácidos), incorporándolas y metabolizándolas en el citoplasma, pero esta vía de aprovechamiento de nitrógeno es menos eficiente que la utilización directa del NID [6][61][78].

Microcystis aeruginosa tiene también la capacidad de almacenar grandes cantidades de fósforo en forma de polifosfatos asociados a otras sustancias en corpúsculos citoplásmicos conocidos como gránulos de cianoficina [39][89]. La capacidad de digestión extracelular de *Microcystis* es bien conocida y puede suministrar cantidades de fósforo y otros nutrientes [23][44][63]. Jiang *et al.* [43] añaden que *Microcystis* puede absorber fósforo directamente de bacterias asociadas a sus colonias [37] (ver abajo).

La literatura ficológica contiene una plétora de referencias a *N. palea* desde el punto de vista taxonómico, ecológico y florístico. Sólo una pequeña fracción de estas referencias son taxonómicamente confiables y se pueden relacionar con la verdadera *N. palea* debido a un caso severo de deriva conceptual taxonómica [87][88], la cual ha conducido a una serie de interpretaciones incorrectas del concepto original, derivando actualmente en un grupo grande de formas morfológicamente similares, pero taxonómicamente diferentes, que se identifican bajo el nombre común de *N. palea* [81]. La revisión del material tipo de ésta diatomea [80] ha permitido una mejor circunscripción taxonómica y además, esta revisión se convierte en un referente para la identificación de la diatomea en ecosistemas alrededor del mundo, incluso para Alalay. Los recientes intentos por caracterizar molecularmente el complejo *N. palea* probablemente resultarán en una mayor precisión en la identificación de esta especie [82].

Desde el punto de vista de las preferencias ecológicas de *N. palea*, aún quedan grandes vacíos y la literatura es muy ambigua al respecto (comparar Cholnoky [17] con Krammer & Lange-Bertalot [47], por ejemplo). Sin embargo, dos citas bibliográficas influyentes actualmente y que frecuentemente se utilizan como base de discusión en bioindicación, es decir, Hofmann [36] y Van Dam *et al.* [85], consideran *N. palea* como una especie saprótrofa (que se nutre facultativamente de materia orgánica y que necesita periódicamente altas concentraciones de nitrógeno orgánico), polisapróbica (que tolera altos contenidos de carbono orgánico y bajas concentraciones de oxígeno disuelto) e hipereutraféntica (que halla su óptimo de crecimiento en ecosistemas eutróficos). Cholnoky [17] añade que *N. palea* característicamente se halla en ecosistemas eutróficos alcalinos y que prefiere lugares oxigenados dentro de ellos. Es decir, Alalay cumple con todos los requerimientos ecológicos de *N. palea*.

Si bien los reportes más frecuentes de *N. palea* se basan en el estudio del bentos, las floraciones de este taxón (aunque raras) se reportan del plancton

[4][27][32]. Las células flotan individualmente y se conoce muy poco acerca del mecanismo de flotación, aunque es posible que la acumulación de crisolaminarina y sus derivados lipídicos contribuyan de sobremanera a este proceso. Gessner [32] y Flower [27] reportaron *N. palea* desarrollándose sobre colonias de *M. aeruginosa*, desarrollo que podría ser un mecanismo alternativo (¿complementario?) que coadyuve en la flotación de la diatomea (ver Burgis *et al.* [13] para el caso de otro huésped sobre *Microcystis*: *Nitzschia microcephala* Grunow). Sin embargo, es posible que la agrupación de ambos organismos no se circunscriba a un mero proceso de flotabilidad asistida, sino que también se extienda a un nexo simbiótico con beneficios nutricionales para ambos organismos [8]. Si bien no existen estudios para el caso específico *M. aeruginosa*-*N. palea*, existen varios estudios sobre diatomeas de agua dulce (e.g., Drum & Pankratz [22], Floener & Bothe [26]) y diatomeas marinas (e.g., Carpenter *et al.* [16], Janson *et al.* [42], Foster & Zehr [28], Gómez *et al.* [34]) en simbiosis con cianobacterias. Pero en estos casos, las cianobacterias son endosimbióticas (cianobiontes) y viven como inclusiones citoplásmicas o en cámaras internas dentro del frústulo de las diatomeas [1]. Para estos casos, la relación es favorable para ambos organismos en cuanto las cianobacterias suministran nitrógeno (al ser fijadoras de nitrógeno atmosférico) y carbono y las diatomeas proveen protección y otros recursos para la sobrevivencia de la cianobacteria [21][41][54][67][91].

DeYoe *et al.* [21] encontraron que en las diatomeas dulceacuícolas *Rhopalodia gibba* (Ehrenb.) O. Müll. y *Epithemia turgida* (Ehrenb.) Kütz. el número de cianobiontes se reducía en ambientes con alto nitrógeno, mientras que ocurría un proceso inverso cuando las concentraciones del nutriente en el medio eran bajas. Esta interacción muestra, entonces, que la asociación de ambos organismos sería ventajosa en sistemas con bajas concentraciones de nitrógeno [1].

3.2 Más argumentos para la hipótesis: metabolismo dentro la asociación *Microcystis*-*Nitzschia*-bacterias

El florecimiento de *M. aeruginosa* requiere de grandes cantidades de nutrientes para dar soporte a la gran densidad que alcanzan las colonias. Las mismas se notan como agregados bastante grandes (hasta medio milímetro en el caso de la floración de Alalay, Fig. 1C), lo cual además de ser el resultado de una división celular acelerada, también puede ser en parte una respuesta a la presión pastoril del zooplancton [95], que en Alalay es diverso y desarrollado, especialmente en periodos en los que las macrófitas no son dominantes [2][56].

Al ser un ecosistema eutrófico, la laguna Alalay contiene una alta cantidad de nutrientes, aunque se ha determinado que la cantidad de especies químicas de nitrógeno es baja durante la mayor parte del año [58][59]. Si bien no existe evidencia experimental, se ha propuesto que esta limitación por nitrógeno se debe a

la absorción rápida por parte de las macrofitas [2][14], pero es factible que tanto el epifiton (dominado por diatomeas) como el fitoplancton (dominado por *Microcystis* y euglenoides) contribuyan grandemente al secuestro de nitrógeno. Esto debido a que ambas comunidades están muy bien desarrolladas en la laguna [58][59] y producen floraciones que persisten todo el año. De hecho, es lógico inferir que el desarrollo masivo de las diatomeas del epifiton de toda la laguna y de *Microcystis* en el fitoplancton de las zonas SO, N, S y NO demanda una gran cantidad de nitrógeno en sus formas de amonio, nitritos y nitratos. Cuando este nitrógeno inorgánico ha sido consumido, los autótrofos requieren fuentes alternativas de nitrógeno y es en este estado que las relaciones simbióticas pueden resultar ventajosas. En esta instancia, *Microcystis* necesita un suministro continuo de nitrógeno no solamente para mantener la división celular, sino también para el proceso de formación de vesículas de gas que la mantienen en suspensión en la zona fótica [61].

Además de *N. palea*, en las colonias de *Microcystis* de Alalay había un desarrollo notorio de bacterias pleomorfas que crecen en la periferie de la matriz mucilaginoso de la cianobacteria, a veces también en proximidad con las células de *Nitzschia*. Tanto la diatomea como las bacterias son capaces de metabolizar materia orgánica extracelularmente a través de la excreción de una serie de enzimas hidrolíticas que rompen moléculas de alto peso molecular en fragmentos asimilables [29][83][84]. Lewin & Hellebust [52] sostienen que *N. palea* puede incorporar carbono mediante heterotrofia cuando la cantidad de materia orgánica en el medio es grande. Ya que las diatomeas y las bacterias del epifiton y fitoplancton (incluyendo *Microcystis*) podrían estar removiendo rápida y efectivamente las sustancias orgánicas de bajo peso molecular por heterotrofia, la demanda de moléculas de carbono orgánico lábil (COL, forma de carbono susceptible de ser directamente incorporada por la célula) es bastante alta, especialmente en aquellos organismos que necesitan dar soporte continuo a una gran biomasa; el caso de *Microcystis*. Francoeur & Wetzel [29] (para perifiton) y Chróst [18] (para fitoplancton) concluyeron que la actividad de proteasas extracelulares bacterianas incrementa en condiciones de bajas concentraciones de NID y de COL. Chróst [18] sostiene que el COL es naturalmente limitante en aguas ya que el 95% de la materia orgánica suspendida en el agua corresponde a moléculas de gran peso molecular que requieren hidrólisis previa a su absorción por parte de organismos vivos. Las bajas concentraciones de nitrógeno y de COL son condiciones que se cumplen en Alalay [2][58][59]. Por otra parte, Francoeur & Wetzel [29] hallaron que la actividad proteolítica extracelular de las bacterias es óptima a un pH cercano a 9. El pH de las zonas dominadas por *Microcystis* en Alalay es superior a 8 [58][59]. Entonces, la actividad enzimática extracelular de *N. palea*, las bacterias que crecen en las colonias de *M. aeruginosa* y la cianobacteria misma puede estar generando cantidades importantes de fósforo, nitrógeno, carbono y otros nutrientes en formas asimilables, como es sugerido por

el trabajo de Brunberg [11], Hofmann [36], Steppe *et al.* [74], Van Dam *et al.* [85] y Worm & Søndergaard [93].

La actividad lítica de las enzimas extracelulares de las diatomeas favorecen el crecimiento de α y γ -proteobacterias [35][45][72][75]; las bacterias reportadas en consorcio con *Microcystis* pertenecen a las Sphingomonadales, las cuales están clasificadas dentro de las α -proteobacterias [53]. Muchas bacterias de este grupo son oxidasa negativas, es decir, que no pueden hidrolizar carbohidratos de cadena larga; son aeróbicas y, por tanto, son incapaces de fermentar, por lo que requieren de fuentes externas de carbohidratos de bajo peso molecular para poder satisfacer la demanda de carbono y energía requerida para su mantenimiento y desarrollo.

Limei *et al.* [53] aislaron *Bosea* sp. de colonias de *M. aeruginosa*, una Sphingomonadal que posee actividad de nitrato-reductasa, una enzima que convierte formas de amonio a nitritos [64]. *Bosea* es un género de bacterias que está también asociado a procesos de fijación de nitrógeno, es decir a la conversión de nitrógeno molecular en amonio, una molécula más asimilable biológicamente [20]. El nitrógeno asimilado a través del proceso de fijación es convertido en glutamato, el cual puede ser excretado fuera de la célula. *Nitzschia palea* (y otras diatomeas) son capaces de utilizar glutamato (entre otras sustancias) extracelularmente [83], haciendo el nitrógeno disponible tanto para sí misma como para *Microcystis*.

Las diatomeas no solamente hidrolizan la materia orgánica alóctona, sino que también secretan una serie de polímeros que se mantienen en la proximidad de sus células y que ellas mismas o las bacterias hidrolizan [83][84]. La cantidad de las sustancias extracelulares secretadas por las diatomeas puede llegar a ser considerable (hasta 8.7 mg/g de sedimento seco) y sucede no solamente en situaciones planctónicas marinas [33], sino también en agua dulce [77] y en el caso específico del género *Nitzschia* [76]. Los metabolitos provenientes de la oxidación de esta materia orgánica autóctona y alóctona a *N. palea* podrían estar dando soporte a la floración de *Microcystis* y en parte a la flora bacteriana desarrollando sobre ella en la laguna Alalay.

4 Conclusión

La hipótesis

La simbiosis *N. palea*-*M. aeruginosa*-bacterias es beneficiosa para el consorcio al asegurar un suministro constante de fósforo, nitrógeno y otros nutrientes. Además de las fuentes orgánicas externas, la secreción continua de exudados orgánicos constituye una fuente constante de nutrientes, los cuales son transformados en moléculas asimilables a través de un proceso de digestión extracelular por parte de los tres tipos de organismos. Estos procesos químicos se verían favorecidos en la parte alta de la columna de agua, donde la luz y el oxígeno son abundantes.

Nitzschia palea, además de obtener sustento para sus altas densidades celulares, también se beneficia al mantenerse suspendida en la zona fótica.

Recientemente, se ha encontrado una co-ocurrencia similar a la descrita aquí en Barra Bonita, una represa eutrófica del estado de Sao Paulo, Brasil. Este manuscrito es un primer paso hacia la investigación fisiológica y molecular de esa agrupación en ambos ecosistemas sudamericanos.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Nora I. Maidana, Universidad de Buenos Aires por su revisión crítica del texto y su contenido científico; varias de sus sugerencias han servido para mejorar este manuscrito.

Bibliografía

- [1] Adams, D.G. 2002. *Symbiotic Interactions*. En: Whitton, B.A. & Potts, M. (Eds.). *The Ecology of Cyanobacteria, their diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers. USA. pp. 523-561.
- [2] Ayala, R.; Acosta, F.; Mooij, W.M.; Rejas, D. & Van Damme, P.A. 2007. *Management of Laguna Alalay: a case study of lake restoration in Andean valleys in Bolivia*. *Aquatic Ecology* 41: 621-630.
- [3] Ayala, R.; Castro, M.; Bayro, V.; Acosta, F. & Rejas, D. 2006. *Interacciones fitoplancton – zooplankton en una laguna eutrofizada del valle de Cochabamba (Bolivia)*. *Revista de Ciencia y Tecnología* 5: 43-50.
- [4] Bednarz, T.; Mazurkiewicz-Borón, G. & Starzecka, A. 2004. *Microbiological processes associated with Nitzschia palea (Kütz.) W. Sm. bloom in a submountain dam reservoir*. *Algological Studies* 114: 133-141.
- [5] Bergman, B.; Gallon, J.R.; Rai, A.N. & Stal, L.J. 1997. *Nitrogen fixation by non-heterocystous cyanobacteria*. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 139-185.
- [6] Bhaya, D.; Schwarz, R. & Grossmann, A.R. 2002. *Molecular responses to environmental stress*. En: Whitton, B.A. & Potts, M. (Eds.). *The Ecology of Cyanobacteria, their diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers. USA. pp. 397-442.
- [7] Boström, B.; Pettersson, A.K. & Ahlgren, I. 1989. *Seasonal dynamics of a cyanobacteria-dominated microbial community in surface sediments of a shallow eutrophic lake*. *Aquatic Sciences* 51: 153-178.
- [8] Bradbury, J.P. 1973. *Ecology of freshwater diatoms*. *Nova Hedwigia* 24: 73-81.

- [9] Brehm, U.; Krumbein, W.E. & Palińska, K.A. 2003. *Microbial spheres: a novel cyanobacterial-diatom symbiosis*. *Naturwissenschaften* 90: 136-140.
- [10] Brunberg, A.K. 1995. *Microbial activity and phosphorus dynamics in eutrophic lake sediments enriched with Microcystis colonies*. *Freshwater Biology* 33: 541-555.
- [11] Brunberg, A.K. 1999. *Contribution of bacteria in the mucilage of Microcystis spp. (Cyanobacteria) to benthic and pelagic bacterial production in a hypereutrophic lake*. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 13-22.
- [12] Brunberg, A.K. & Blomqvist, P. 2002. *Benthic overwintering of Microcystis colonies under different environmental conditions*. *Journal of Plankton Research* 24: 1247-1252.
- [13] Burgis, J.B.; Darington, J.P.E.C.; Dunn, I.G.; Ganf, G.G.; Gwahaba, J.J. & McGowan, L.M. 1973. *The biomass and distribution of organisms in Lake George, Uganda*. *Proceedings of the Royal Society, London B* 184: 271-298.
- [14] Cadima, F.M. 1998. *Algas y macrófitas de la laguna Alalay (Cochabamba-Bolivia)*. *Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental* 3: 35-46.
- [15] Carmichael, W.W. 1992. *Cyanobacteria secondary metabolites-the cyanotoxins*. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 445-459.
- [16] Carpenter, E.J.; Montoya, J.P.; Burns, J.; Mulholland, M.; Subramaniam, A. & Capone, D.G. 1999. *Extensive bloom of a N-fixing diatom/cyanobacterial association in the Tropical Atlantic Ocean*. *Marine Ecology Progress Series* 185: 273-283.
- [17] Cholnoky, B.J. 1962. *Beiträge zur Kenntnis der Ökologie der Diatomeen in Ost-Transvaal*. *Hydrobiologia* 19(1): 57-119.
- [18] Chróst, R.J. 1991. *Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes*. En: Chróst, R.J. (Ed.) *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer-Verlag, New York. pp 29-59.
- [19] de la Barra, N. 2003. *Clasificación ecológica de la vegetación acuática en ambientes lacustres de Bolivia*. *Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental* 13: 65-93.
- [20] De Meyer, S.E. & Willems, A. 2011. *Multilocus sequence analysis of Borea species and description of Borea lupine sp. nov., Borea lathyri sp. nov. and Borea robiniae sp. nov., isolated from legumes*. *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology* 62(Pt. 10): 2505-2510.
- [21] DeYoe, H.R.; Lowe, R.L. & Marks, J.C. 1992. *Effects of nitrogen and phosphorous on the endosymbiont load of Rhopalodia gibba and Epithemia turgida (Bacillariophyceae)*. *Journal of Phycology* 28: 773-777.

- [22] Drum, R.W & Pankratz, S. 1965. *Fine structure of an unusual cytoplasmic inclusion in the diatom genus, Rhopalodia*. Protoplasma 60: 141-149.
- [23] Dziga, D.; Goral, T.; Bialczyk, J. & Lechowski, Z. 2009. *Extracellular enzymes of the Microcystis aeruginosa PCC 7813 strain are inhibited in the presence of hydroquinone and pyrogallol, allelochemicals produced by aquatic plants*. Journal of Phycology. 45: 1299-1303.
- [24] Fallon, R.D. & Brock, T.D. 1981. *Overwintering of Microcystis in Lake Mendota*. Freshwater Biology 11: 217-226.
- [25] Ferber, L.R.; Levine, S.N. ; Lini, A. & Livingston, P. 2004. *Do cyanobacteria dominate in eutrophic lakes because they fix atmospheric nitrogen?* Freshwater Biology 49: 690-708.
- [26] Floener, L. & Bothe, H. 1980. *Nitrogen fixation in Rhopalodia gibba, a diatom containing blue-greenish inclusions symbiotically*. En: Schwemmler, W. & Schenk, H.E.A. (Eds.). Endo-cytobiology, Endosymbiosis and Cell Biology. Vol 1. Walter de Gruyter & Co., Berlin, pp. 541-552.
- [27] Flower, R.J. 1982. *The occurrence of an epiphytic diatom on Microcystis aeruginosa*. Irish Naturalist Journal 20(12): 553-555.
- [28] Foster, R.A. & Zehr, J.P. 2004. *Characterization of diatom-cyanobacteria symbioses on the basis of nifH, hetR and 16S rRNA sequences*. Environmental Microbiology 8: 1913-1925.
- [29] Francoeur, S.N. & Wetzel, R.G. 2003. *Regulation of periphytic leucine-aminopeptidase activity*. Aquatic Microbial Ecology 31: 249-258.
- [30] Frangeul, L.; Quillardet, P.; Castets, A-M. ; Humbert, J.-F. ; Matthijs, C.P.H.; Cortez, D.; Tolonen, A.; Zhang, C.-C.; Gribaldo, S.; Kehr, J-C.; Zilliges, Y.; Ziemert, N.; Becker, S.; Talla, E.; Latifi, A.; Billault, A.; Lepelletier, A.; Dittmann, E.; Bouchier, C. & Tandeau de Marsac, N. 2008. *Highly plastic genome of Microcystis aeruginosa PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium*. BMC Genomics 9: 274-293.
- [31] Geitler, L. 1977. *Zur Entwicklungsgeschichte der Epithemiaceen Epithemia, Rhopalodia und Denticula (Diatomophyceae) und ihre vermutlich symbiotischen Sphäroidkörper*. Plant Systematics and Evolution 128: 259-275.
- [32] Gessner, F. 1956. *Das Plankton des Lago Maracaibo*. Ergebnisse der Limnologie, Venezuela-Expedition 1: 67-92.
- [33] Giroldo, D.; Viera, A.A.H. & Paulsen, B.S. 2003. *Relative increase in deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide release by a tropical*

- freshwater* Thalassiosira sp. (Bacillariophyceae). Journal of Phycology 39: 1109-1115.
- [34] Gómez, F.; Furuya, K. & Takeda, S. 2005. *Distribution of the cyanobacterium Richelia intracellularis as an epiphyte of the diatom Chaetoceros compressus in the western Pacific Ocean*. Journal of Plankton Research 27: 323-330.
- [35] Haynes, K.; Hofmann, T.A.; Smith, C.J.; Ball, A.S.; Underwood, G.J.C. & Osborne, A.M. 2007. *Diatom-derived carbohydrates as factors affecting bacterial community composition in estuarine sediments*. Applied and Environmental Microbiology 73(19): 6112-6124.
- [36] Hofmann, G. 1994. *Aufwuchs-Diatomeen in Seen und ihre Eignung als Indikatoren der Trophie*. Bibliotheca Diatomologica 30: 1-241.
- [37] Hoppe, H.G. 1981. *Blue-green algae agglomeration in surface water: A microbiotope of high bacterial activity*. Kieler Meeresforsch 5: 291-303.
- [38] Ibelings, B.W.; Mur, L.R. & Walsby, A.E. 1991. *Diurnal changes in buoyancy and vertical distribution in populations of Microcystis in two shallow lakes*. Journal of Plankton Research 13: 419-436.
- [39] Jacobson, L., & Halmann, M. 1982. *Polyphosphate metabolism in the blue-green alga Microcystis aeruginosa*. Journal of Plankton Research 4: 481-488.
- [40] Janson, S. 2003. *Cyanobacteria in symbiosis with diatoms*. En: Rai, A.N., Bergman, B. & Rasmussen, U. (Eds.). Cyanobacteria in Symbiosis. Kluwer Academic Publishers, New York. pp. 1-10.
- [41] Janson, S.; Rai, A.N. & Bergman, B. 1995. *The intracellular cyanobiont Richelia intracellularis: Ultrastructure and immune-localisation of phycoerythrin, nitrogenase, Rubisco and glutamine synthetase*. Marine Biology 124: 1-8.
- [42] Janson, S.; Wouters, J.; Bergman, B. & Carpenter, E.J. 1999. *Host specificity in the Richelia-diatom symbiosis revealed by hetR gene sequence analysis*. Environmental Microbiology 1: 431-438.
- [43] Jiang, L.; Yang, L.; Xiao, L.; Shi, X.; Gao, G. & Qin, B. 2007. *Quantitative studies on phosphorus transference occurring between Microcystis aeruginosa and its attached bacterium (Pseudomonas sp.)*. Hydrobiologia 581: 161-165.
- [44] Kirkwood, A.E.; Nalewajko, C. & Fulthorpe, R.R. 2006. *The effects of cyanobacterial exudates on bacterial growth and biodegradation of organic contaminants*. Microbial Ecology 51: 4-12.
- [45] Kisand, V.; Cuadros, R. & Wikner, J. 2002. *Phylogeny of culturable estuarine bacteria catabolizing riverine organic matter in the Northern Baltic Sea*. Applied Environmental Microbiology 68: 379-388.

- [46] Klemmer, A.R. 1991. *Effects of nutritional status on cyanobacterial buoyancy, blooms, and dominance, with special reference to inorganic carbon*. Canadian Journal of Botany 69: 1133-1138.
- [47] Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. 1988. *Bacillariophyceae. 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae*. En: Ettl, H., Gerloff, J., Heynig, H. & Mollenhauer, D. (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 2(2): 1-596. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- [48] Krivstov, V.; Bellinger, E.G. & Sigee, D.C. 2005. *Elemental composition of Microcystis aeruginosa under conditions of lake nutrient depletion*. Aquatic Ecology 39: 123-134.
- [49] Kurmayer, R. & Christiansen, G. 2009. *The genetic basis of toxin production in cyanobacteria*. Freshwater Reviews 2: 31-50.
- [50] Lakatos, M.; Lange-Bertalot, H. & Büdel, B. 2004. *Diatoms living inside the thallus of the green algal lichen Coenogonium linkii in neotropical lowland rain forests*. Journal of Phycology 40: 70-73.
- [51] Lara, C.; Romero, J.M. & Guerrero, M.G. 1987. *Regulated nitrate transport in the cyanobacterium Anacystis nidulans*. Journal of Bacteriology 169: 4376-4378.
- [52] Lewin, J. & Hellebust, A. 1976. *Heterotrophic nutrition of the marine diatom Nitzschia angularis var. affinis*. Marine Biology 36: 313-320.
- [53] Limei, S.; Yuanfeng, C.; Hualin, Y.; Peng, X.; Pengfu, L.; Lingdong, K. & Fanxiang, K. 2009. *Phylogenetic diversity and specificity of bacteria associated with Microcystis aeruginosa and other cyanobacteria*. Journal of Environmental Sciences 21: 1581-1590.
- [54] Mague, T.H.; Weare, M.M. & Holm-Hansen, O. 1974. *Nitrogen fixation in the north Pacific Ocean*. Marine Biology 24: 109-119.
- [55] Maldonado, M.; Van Damme, P. & Rojas, J. 1998. *Contaminación y eutrofización en la Cuenca del Río Rocha (Cochabamba)*. Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental 3: 3-9.
- [56] Meneses, L. 1998. *Estructura de la comunidad de cladóceros en la laguna Alalay (Cochabamba, Bolivia)*. Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental 3: 47-58.
- [57] Moezelaar, R. & Stahl, L.J. 1994. *Fermentation in the unicellular cyanobacterium Microcystis PCC7806*. Archives of Microbiology 162: 63-69.
- [58] Morales, E.A. & Rivera, S.F. 2012. *Choice of macrophyte substrate in the use of diatoms as indicators of water quality assessment: preliminary data on the case of Alalay Pond (Cochabamba, Bolivia)*. Lakes, Reservoirs and Ponds 6(1-2): 20-42.

- [59] Morales, E.A. & Rivera, S.F. 2013. *Macrófitas poco frecuentes o desconocidas de la laguna Alalay, Cochabamba, Bolivia*. Acta Nova 6(1-2): 36-52.
- [60] Navarro, G. & Maldonado, M. 2011. *Geografía ecológica de Bolivia. Vegetación y ambientes acuáticos*. 5ta Edición. Centro de Ecología Simón I. Patiño-Departamento de Difusión. Santa Cruz, Bolivia. 719 pp.
- [61] Oliver, R.L. & Ganf, G.G. 2002. *Freshwater blooms*. En: Whitton, B.A. & Potts, M. (Eds.). *The Ecology of Cyanobacteria, their diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers. USA. pp. 149-194.
- [62] Paerl, H.W.; Bland, P.T.; Bowles, N.D. & Haibach, M.E. 1985. *Adaptation to high-intensity, low-wavelength light among surface blooms of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology 49: 1046-1052.
- [63] Pandey, V.D. & Parveen, S. 2011. *Alkaline phosphatase activity in cyanobacteria: physiological and ecological significance*. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences 1(4): 295-303.
- [64] Pang, C.M. & Liu, W.T. 2007. *Community structure analysis of reverse osmosis membrane biofilms and the significance of Rhizobiales bacteria in biofouling*. Environmental Science and Technology 41(3): 4728-4734.
- [65] Pérez, M. 2005. *Especiación de metales pesados en sedimentos de la laguna Alalay*. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, 90 pp.
- [66] Preston, T.; Stewart, W.D.P. & Reynolds, C.S. 1980. *Bloom-forming cyanobacterium Microcystis aeruginosa overwinters on sediment surface*. Nature 288: 365-367.
- [67] Rai, A.N. 1990. *Cyanobacteria in symbiosis*. En: Rai, A.N. (Ed.). *CRC Handbook of Symbiotic Cyanobacteria*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp. 1-7.
- [68] Rai, A.N.; Bergman, B. & Rasmussen, U. (Eds.). 2003. *Cyanobacteria in Symbiosis*. Kluwer Academic Publishers, New York. 355 pp.
- [69] Reimer, C.W. & Lee, J.J. 1988. *New species of endosymbiotic diatoms (Bacillariophyceae) inhabiting larger foraminifera in the Gulf of Elat (Red Sea), Israel*. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 140: 339-351.
- [70] Reynolds, C.S.; Jaworsky, G.H.M.; Cmiech, H.A. & Leedale, G.F. 1981. *On the annual cycle of the blue-green algae Microcystis aeruginosa Kütz.; emend. Elenkin*. Philosophical Transactions of the Royal Society, London Ser. B 293: 419-477.

- [71] Rivera, S.F. 2012. *Desarrollo de una herramienta de diagnóstico ambiental para ecosistemas acuáticos lénticos: adecuación de índices diatomológicos para la determinación del estado trófico de la laguna Alalay, Cochabamba-Bolivia*. Tesis para la obtención del grado de Licenciatura en Ingeniería Ambiental. Universidad Católica Boliviana “San Pablo”, Cochabamba, Bolivia, 163 pp.
- [72] Selje, N.; Brinkhoff, T. & Simon, M. 2005. Detection of abundant bacteria in the Weser estuary by culture-dependent and culture-independent approaches. *Aquatic Microbiological Ecology* 39: 17-34.
- [73] Shen, H.; Niu, Y.; Xie, P.; Tao, M. & Yang, X. 2011. *Morphological and physiological changes in Microcystis aeruginosa as result of interactions with heterotrophic bacteria*. *Freshwater Biology* 56: 1065-1080.
- [74] Steppe, T.F.; Olson, J.B.; Paerl, H.W.; Litaker, R.W. & Belnap, J. 1996. *Consortial N fixation: a strategy for meeting nitrogen requirements of marine and terrestrial cyanobacterial mats*. *FEMS Microbiology Ecology* 21: 149-156.
- [75] Stevens, H.; Stübner, M.; Simon, M. & Brinkhoff, T. 2005. *Phylogeny of Proteobacteria and Bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem*. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 351-365.
- [76] Sullivan, C.W. & Volcani, B.E. 1974. *Synergistically stimulated (Na⁺, K⁺)-adenosine triphosphatase from plasma membrane of a marine diatom (Nitzschia alba)*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* 71(11) 4376-4380.
- [77] Sundh, J. 1992. *Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by heterotrophic bacteria*. *Applied Environmental Microbiology* 58: 2938-2947.
- [78] Takamura, N.; Iwakuma, T. & Yasuno, M. 1987. *Uptake of ¹³C and ¹⁵N (ammonium, nitrate and urea) by Microcystis in Lake Kasumigaura*. *Journal of Plankton Research* 9: 151-165.
- [79] Topachevskiy, A.V.; Braginskiy, L.P. & Sirenko, L.A. 1969. *Massive development of blue-green algae as a product of the ecosystem of a reservoir*. *Hydrobiological Journal* 5: 1-10.
- [80] Trobajo, R. & Cox, E.J. 2006. *Examination of the type material of Nitzschia frustulum, N. palea and N. palea var. debilis*. En: Witkowski, A. (ed.). *Eighteenth International Diatom Symposium 2004*. Miedzyzdroje, Poland. Biopress Limited, England. pp. 431-445.
- [81] Trobajo R.; Clavero, E.; Chepurnov, V.A.; Sabbe, K.; Mann, D.G.; Ishihara, S. & Cox E.J. 2009. *Morphological, genetic, and mating diversity within the widespread bioindicator Nitzschia palea (Bacillariophyta)*. *Phycologia* 48: 443-459.

- [82] Trobajo, R.; Mann, D.G.; Clavero, E.; Evans, K.M.; Vanormeligen, P. & McGregor, R.C. 2010. *The use of partial *cox1*, *rbcL* and LSU rDNA sequences for phylogenetics and species identification within the Nitzschia palea species complex (Bacillariophyceae)*. European Journal of Phycology 45: 413-425.
- [83] Tuchman, N. C. 1996. *The role of heterotrophy in benthic algae*. En: Stevenson, R. J., Bothwell, M. & Lowe, R. (Eds.). Algal Ecology: Freshwater Benthic Habitats. Academic Press, San Diego. pp. 299-319.
- [84] Tuchman, N.C.; Schollet, M.A.; Rier, S.T. & Geddes, P. 2006. *Differential heterotrophic utilization of organic compounds by diatoms and bacteria under light and dark conditions*. Hydrobiologia 561: 167-177.
- [85] Van Dam, H.; Mertens, A. & Sinkeldam, J. 1994. *A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands*. Netherlands Journal of Aquatic Ecology 28: 117-133.
- [86] Van Damme, P.A.; Romero, A.M.; Goitia, E.; Rojas, J.; Cadima, M.; Arce, O. & Romero, M. 1997. *Evaluación de estrategias actuales y alternativas para la recuperación de la laguna Alalay (Cochabamba)*. Centro de Medio Ambiente y Recursos Renovables CEMAR, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba. 91 pp.
- [87] Van de Vijver, B.; Lange-Bertalot, H. & Compère, P. 2009. *Two new freshwater diatom species (Bacillariophyceae) from a small pool in the National Botanic Garden of Belgium*. Belgium Journal of Botany 142: 194-203.
- [88] Van de Vijver, B.; Mataloni, G.; Stanish, L. & Spaulding, S.A. 2010. *New and interesting species of the genus Muellieria (Bacillariophyta) from the Antarctic region and South Africa*. Phycologia 49: 22-41.
- [89] van den Hoek, C.; Mann, D.G. & Jahns, H.M. 1995. *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, USA. 623 pp.
- [90] Walsby, A.E. 1994. *Gas vesicles*. Microbiological Review 58: 94-144.
- [91] Weare, N.M.; Azam F.; Mague T.H. & Holm-Hansen, O. 1974. *Microautoradiographic studies of the marine phycobionts Rhizosolenia and Richelia*. Journal Phycology 10: 369-371.
- [92] Whitton, B.A. & Potts. M. 2002. *Introduction to the cyanobacteria*. En: Whitton, B.A. & Potts, M. (Eds.). The Ecology of Cyanobacteria, their diversity in Time and Space. Kluwer Academic Publishers. USA. pp. 1-11.
- [93] Worm, J. & Søndergaard, M. 1998. *Dynamics of heterotrophic bacteria attached to Microcystis spp. (Cyanobacteria)*. Aquatic Microbial Ecology 14: 19-28.

- [94] Yadav, S.; Sinha, R.P.; Tyagi, M.B. & Kumar, A. 2011. *Cyanobacterial secondary metabolites*. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2(2): 144-167.
- [95] Yang, Z. & Kong, F. 2012. *Formation of large colonies: a defense mechanism of Microcystis aeruginosa under continuous grazing pressure by the flagellate Ochromonas sp.* Journal of Limnology 71: 61-66.
- [96] Zohary, T. & Robarts, R.D. 1989. *Diurnal mixed layers and the long-term dominance of Microcystis aeruginosa*. Journal of Plankton Research 11: 25-48.