

**Universidad Mayor de San Andrés**

**Facultad de Ciencias Puras y Naturales**

**Carrera de Ciencias Biológicas**



**“Evaluación de la composición de isótopos estables de carbono y nitrógeno en cuatro compartimientos de Bahía Cohana del lago menor del Lago Titicaca”**

**Presentado por:** Univ. Carlos Rodrigo Heredia Aguilar

**Tutor:** Darío Achá Cordero Ph.D.

**Asesor científico:** David Point Ph.D.

La Paz – Bolivia  
2016

**Universidad Mayor de San Andrés**

**Facultad de Ciencias Puras y Naturales**

**Carrera de Ciencias Biológicas**

**“Evaluación de la composición de isótopos estables de carbono y nitrógeno en cuatro compartimientos de Bahía Cohana del lago menor del Lago Titicaca”**

**Tesis de grado para optar al título de licenciatura en biología**

**Postulante:** Carlos Rodrigo Heredia Aguilar

.....

Tutor: Darío Achá Cordero, Ph.D.

.....

Asesor: David Point, Ph.D.

.....

Tribunal 1: Isabel Morales Belpaire Ph.D.

.....

Tribunal 2: Stéphane Guédron Ph.D.

.....

Jefe de Carrera: Darío Achá Cordero, Ph.D.

La Paz –Bolivia

2016

“Dedicado a mis padres y a mi hermana, por la infinita paciencia y por el apoyo y la confianza incondicional”

# TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO. - .....</b>	<b>2</b>
1.1. EL SISTEMA TDPS .....	2
1.2. EL LAGO TITICACA .....	3
1.2.1. <i>Características morfológicas</i> .....	3
1.2.2. <i>Características hidrológicas</i> .....	5
1.2.3 <i>Vegetación acuática</i> .....	5
1.2.4. <i>Fitoplancton</i> .....	6
1.3. LA BAHÍA DE COHANA.....	6
1.4. LA EUTROFIZACIÓN.....	8
1.4.1. <i>Efectos de la eutrofización</i> .....	9
1.4.2. <i>Eutrofización en la Bahía de Cohana</i> .....	10
1.5. ISÓTOPOS ESTABLES.....	11
1.5.1. <i>Fraccionamiento isotópico</i> .....	12
1.5.2. <i>Medición</i> .....	13
1.5.3. <i>Isótopos de nitrógeno</i> .....	13
1.5.4. <i>Isótopos de carbono</i> .....	14
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1. OBJETIVO GENERAL.- .....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.-.....	16
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1. ÁREA DE ESTUDIO .....	17
3.2. TOMA DE MUESTRAS .....	18
3.2.1. <i>Macrófitas, perifiton y sedimentos</i> .....	19
3.2.2. <i>Materia orgánica particulada (MOP)</i> .....	19
3.3. TRATAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	19
3.3.1. <i>Encapsulado</i> .....	20
3.4. ANÁLISIS ISOTÓPICO .....	20
3.5. FÍSICO-QUÍMICA DEL AGUA .....	21
3.5.1. <i>Carbono Orgánico Disuelto (COD)</i> .....	21
3.5.2. <i>Datos fisicoquímicos</i> .....	21
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	21
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>22</b>
4.1. FÍSICOQUÍMICA DEL AGUA .....	22

4.1.1. Carbono Orgánico Disuelto (COD).....	22
4.1.2. Datos multiparamétricos.....	23
4.1.3. Nutrientes .....	25
4.2. ISÓTOPOS ESTABLES .....	26
4.2.1. Nitrógeno ( $\delta^{15}N$ ).....	26
4.2.1.1. $\delta^{15}N$ en macrófitas .....	26
4.2.1.2. $\delta^{15}N$ en la materia orgánica particulada (MOP) .....	28
4.2.1.3. $\delta^{15}N$ en el sedimento.....	29
4.2.1.4. $\delta^{15}N$ en el perifiton .....	31
4.2.2. Carbono ( $\delta^{13}C$ ).....	33
4.2.2.1. $\delta^{13}C$ en macrófitas .....	33
4.2.2.2. $\delta^{13}C$ en la materia orgánica particulada (MOP) .....	36
4.2.2.3. $\delta^{13}C$ en el sedimento.....	37
4.2.2.4. $\delta^{13}C$ en el perifiton.....	38
4.2.3. Relaciones $\delta^{15}N$ y $\delta^{13}C$ .....	40
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>
5.1. RECOMENDACIONES.....	45
<b>6. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>46</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.- .....</b>	<b>47</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Mapa esquemático del sistema TDPS y sus cuatro sub-cuencas .....	4
<b>Figura 1.2.</b> Ubicación de la Bahía de Cohana en el Lago Menor.....	7
<b>Figura 3.1.</b> Principales tributarios de la Bahía de Cohana .....	17
<b>Figura 3.2.</b> Puntos de muestreo en Bahía Cohana y sitios adicionales.....	18
<b>Figura 4.1.</b> Variación del pH y oxígeno disuelto (OD) en relación con la distancia al río Katari .....	24
<b>Figura 4.2.</b> Composición isotópica de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para macrófitas y su relación con la distancia al Río Katari .....	27
<b>Figura 4.3.</b> Composición isotópica de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para MOP y su relación con la distancia al Río Katari .....	29
<b>Figura 4.4.</b> Composición isotópica de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para sedimentos y su relación con la distancia al Río Katari .....	30
<b>Figura 4.5.</b> Composición isotópica de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para perifiton y su relación con la distancia al Río Katari .....	32
<b>Figura 4.6.</b> Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) para macrófitas y su relación con la distancia al Río Katari .....	34
<b>Figura 4.7.</b> Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) para MOP y su relación con la distancia al Río Katari .....	36
<b>Figura 4.8.</b> Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) para sedimentos y su relación con la distancia al Río Katari .....	38
<b>Figura 4.9.</b> Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) para perifiton y su relación con la distancia al Río Katari .....	39
<b>Figura 5.1.</b> Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en Bahía Cohana y el Lago Menor .....	41
<b>Figura 5.2.</b> Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para el transecto en Bahía Cohana.....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 4.1.</b> Datos fisicoquímicos del agua para cada sitio de muestreo en Bahía Cohana para el mes de abril de 2013 .....	24
<b>Tabla 4.2.</b> Composición isotópica de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en macrófitas, MOP, sedimentos y perifiton para Bahía Cohana (2013) .....	26
<b>Tabla 4.3.</b> Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en macrófitas, MOP, sedimentos y perifiton para Bahía Cohana (2013) .....	33

## RESUMEN

La Bahía de Cohana presenta un estado crónico de eutrofización y el más avanzado de todo el lado boliviano del Lago Titicaca. Los trabajos realizados en la bahía son escasos, localizados y presentan limitaciones para el monitoreo del proceso eutrófico. En el presente trabajo, se examinó el fraccionamiento isotópico de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) y carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en productores primarios y en el sedimento a lo largo de un gradiente de eutrofización en Bahía Cohana y otras zonas dentro del Lago Menor para evaluar el uso de marcadores isotópicos como herramientas de monitoreo del enriquecimiento orgánico y poder relacionarlo con actividades humanas específicas. El  $\delta^{15}\text{N}$  mostró, en todos los casos, estar negativamente correlacionado con la distancia a la fuente de contaminación, mientras que el  $\delta^{13}\text{C}$  mostró una correlación positiva sólo en dos de los productores primarios (macrófitas y MOP) y en el sedimento. El patrón observado para el  $\delta^{15}\text{N}$  sugiere que el N antropogénico que llega a la bahía está siendo aprovechado por los productores primarios y se origina predominantemente a partir de desagües humanos. El patrón observado para el  $\delta^{13}\text{C}$  sugiere que el carbono que llega a la bahía es mayoritariamente alóctono, a pesar del carbono local generado por la estimulación de la productividad primaria durante la eutrofización. La relación entre ambos parámetros isotópicos permite establecer una firma isotópica de referencia para el lago menor, diferenciándola de la que proviene de efectos antropogénicos con lo que se observa que el proceso de eutrofización se encuentra única y exclusivamente dentro de la Bahía de Cohana. Este trabajo es uno de los pocos que muestra la efectividad del uso de marcadores isotópicos para determinar procesos de eutrofización en un lago de altura como lo es el Titicaca.

# “EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE ISÓTOPOS ESTABLES DE CARBONO Y NITRÓGENO EN CUATRO COMPARTIMIENTOS DE BAHÍA COHANA DEL LAGO MENOR DEL LAGO TITICACA”

## 1. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO. -

Los recursos hídricos en todo el mundo están sujetos a grandes presiones, a causa de su uso para consumo humano y ganado o debido a temas de contaminación (UNESCO 2009; Hoekstra and Mekonnen 2011). En consecuencia, las últimas décadas han estado marcadas por una tendencia en la disminución de la disponibilidad de agua per cápita en muchos países (Quentin Grafton, Pittock et al. 2013), ocasionados principalmente por cambios demográficos y el incremento de las actividades económicas a nivel global (Oki and Kanae 2006). En este sentido, se ha observado que más de 2 billones de personas viven actualmente en áreas de estrés hídrico, ya sea por la distribución desigual de los recursos renovables de agua dulce (Oki and Kanae 2006) o por los factores demográficos y económicos anteriormente mencionados.

La región semi-árida del Altiplano es una zona que presenta estas características, debido a que las cuencas endorreicas que forman el sistema hídrico altiplánico dependen casi en su totalidad de las precipitaciones episódicas durante los meses de diciembre a marzo, en la época húmeda o verano austral (Ronchail, Espinoza et al. 2014).

### 1.1. El sistema TDPS

El sistema hídrico altiplánico puede ser dividido a su vez en cuatro sub-cuencas endorreicas, cada una de las cuales con características particulares pero que en su conjunto han venido a denominarse como sistema **TDPS** (Molina and Satgé 2014). Estas sub-cuencas son la del Titicaca (56200 km<sup>2</sup>), la del río Desaguadero (29843 km<sup>2</sup>), la del lago Poopó (24829 km<sup>2</sup>) y la del Salar de Coipasa (32958 km<sup>2</sup>) (**Fig. 1.1**), con una superficie total aproximada de 143900 km<sup>2</sup> (Lorini, Chavez et al. 2011).

Este sistema es altamente sensible ante las variaciones del flujo hídrico, debido al hecho de que la precipitación y el deshielo de los glaciares son los dos reguladores, a gran escala, del régimen hídrico de toda la región (Garreaud and Aceituno 2001). En este sentido, cambios relativamente moderados en la precipitación y en los procesos de evaporación han llevado, por ejemplo, a variaciones en el nivel del lago Titicaca de hasta 5 metros, como los observados durante los años 1933-1934 y 1986-1987 (Ronchail, Espinoza et al. 2014). Aún más, las zonas del sistema que limitan con la cuenca amazónica, es decir, al norte y al este,

presentan mayor humedad, con valores de precipitación que pueden alcanzar los 1100 mm de lluvia por año, mientras que las zonas al sur y al oeste del sistema pueden tener valores de precipitación de tan solo 200 milímetros al año (Roche, Bourges et al. 1991; Molina and Satgé 2014). A pesar de estos regímenes hídricos extremos, el conjunto de sub-cuencas que forman el sistema TDPS ha permitido el desarrollo de la agricultura y la generación del sustento hídrico necesario para mantener a múltiples comunidades locales durante miles de años, hasta la actualidad (Morales, Christie et al. 2012).

## **1.2. El Lago Titicaca**

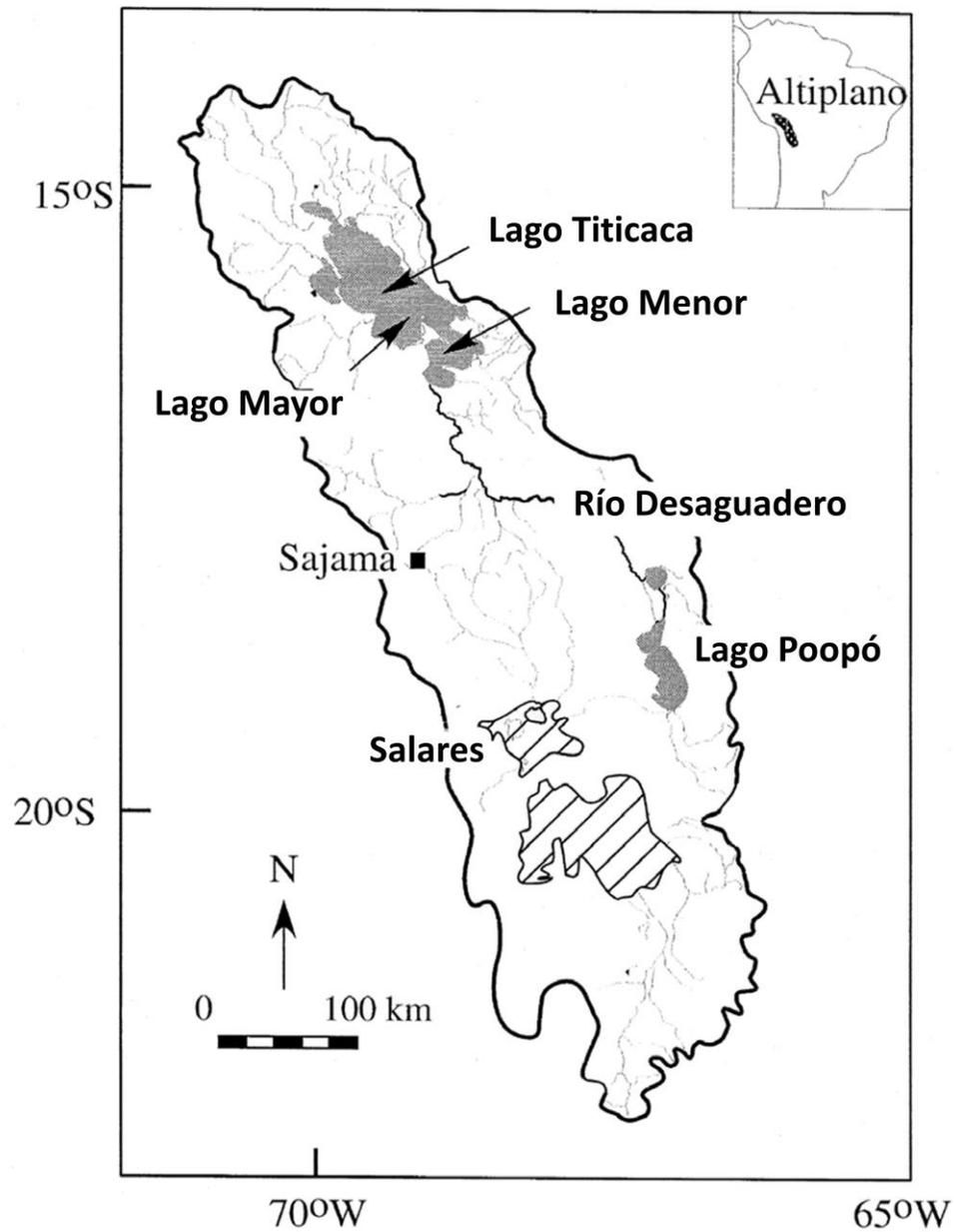
El lago Titicaca es el mayor cuerpo de agua dulce transfronterizo de América del Sur (Pouilly, Lazzaro et al. 2014). Con una altitud de 3810 m.s.n.m., se encuentra dividido geográficamente en dos lagos o sub-cuencas lacustres de características bien diferenciadas, las cuales se conectan a través de un paso de agua de aproximadamente 800 metros de ancho, conocido como el estrecho de Tiquina (Boulangé and Aquize 1981; Wirrmann 1991).

Es compartido por la República del Perú (a la cual pertenece el 55% del lago) y el Estado Plurinacional de Bolivia (con el 45% restante) (Lorini, Chavez et al. 2011). El Lago Mayor o Chucuito, ubicado al noroeste, es más grande y profundo mientras que el Lago Menor o Huiñaimarca, ubicado al sur, es pequeño y relativamente somero (Dejoux and Iltis 1991).

### **1.2.1. Características morfométricas**

El lago Titicaca es de forma elipsoidal y presenta una orientación noroeste-sudeste (Boulangé and Aquize 1981). Posee un borde costero en general bien establecido, aunque poco definido en el norte y oeste, debido a las planicies de inundación que se forman a partir de los afluentes que llegan al lago (Wirrmann 1991). Sin embargo, se ha calculado un perímetro costero de entre 915 y 1125 km (Roche, Bourges et al. 1991; Lorini, Chavez et al. 2011), con una longitud máxima (siguiendo una línea N.NO-S.SE que atraviesa el estrecho de Tiquina) de entre 178 y 204 km (Wirrmann 1991; Lorini, Chavez et al. 2011) y un ancho de 65 km para el Lago Mayor y de 41 km para el Lago Menor, equivaliendo a un volumen medio de 903 km<sup>3</sup> (Wirrmann 1991) y una superficie total de 8440 km<sup>2</sup> (Lorini, Chavez et al. 2011).

El Lago Mayor se caracteriza por fuertes pendientes, con una profundidad media de 135 metros y una máxima de 284 metros, cerca de la isla de Soto (Wirrmann 1991). Con una superficie de 7131 km<sup>2</sup>, representa el 84% de la superficie total y contiene el 98,5% (889 km<sup>3</sup>) del volumen de agua (Boulangé and Aquize 1981).



**Figura 1.1.- Mapa esquemático del sistema TDPS y sus cuatro sub-cuencas. Tomado de Paduano, Bush et al. (2003).**

El Lago Menor por su parte, posee pendientes muy leves y tiende a ser poco profundo, con menos de 5 metros en el 56% de su superficie y con una profundidad máxima de 41 metros, en la fosa de Chua (Wirrmann 1991). Posee una superficie de 1426 km<sup>2</sup>, la cual representa el 16% restante en superficie, pero contiene sólo el 1,5% (14 km<sup>3</sup>) del volumen total del lago (Boulangé and Aquize 1981).

### **1.2.2. Características hidrológicas**

El lago Titicaca posee un régimen hidrológico particular, con variaciones en el nivel del agua explicadas por las fluctuaciones anuales entre los flujos hídricos de entrada y de salida (Carmouze and Aquize 1981). Las precipitaciones anuales (70% de las cuales suceden durante la época húmeda) reponen el 47% del volumen entrante de agua (Boulangé and Aquize 1981), habiéndose registrado valores de 1300 mm de precipitación sobre el lago, debido a la afectación local que éste mismo genera (Molina and Satgé 2014). El restante 53% de los aportes es generado por los afluentes de la cuenca (Roche, Bourges et al. 1991), 80% de los cuales ocurren durante los cuatro meses de la época húmeda. Dos tercios de los aportes fluviales están representados por las 6 sub-cuencas más importantes del lago: los ríos Ramis, Coata, Ilave, Katari, Huancané y Suches (Carmouze and Aquize 1981; Roche, Bourges et al. 1991).

Por su parte, el flujo hídrico de salida está caracterizado por tres procesos diferentes. La primera es la evapotranspiración, equivalente al 90% de la pérdida total de agua del lago, con valores de pérdida potenciales estimados entre 1000 y 1850 mm de agua por año (Carmouze and Aquize 1981; Roche, Bourges et al. 1991). El segundo abarca procesos de infiltración, los cuales alcanzan a representar el 9% de la pérdida total, mientras que el último proceso implica el flujo a través del río Desaguadero, único efluente del lago, el cual representa el 1% restante (Carmouze and Aquize 1981; Roche, Bourges et al. 1991).

### **1.2.3 Vegetación acuática**

La vegetación acuática del lago Titicaca puede ser sectorizada y dividida en cuatro etapas según la descripción de Iltis y Mourguiart (1991). La primera es la zona que comprende la superficie entre las orillas y el cinturón de totoras, aproximadamente entre los 20 centímetros y los 2, 5 metros de profundidad, en la que típicamente se pueden encontrar los géneros *Myriophyllum sp.* y *Elodea sp.*; y con menor predominancia a *Potamogeton sp.*, *Stuckenia sp.* y *Zannichellia sp.* (Iltis and Mourguiart 1991; Navarro and Maldonado 2002).

La segunda etapa comprende las agrupaciones de *Schoenoplectus californicus* (totora) que por lo general forman una gruesa franja entre los 2,5 y 5 metros de profundidad (Raynal-Roques 1991; Navarro and Maldonado 2002). En esta zona también se puede observar el desarrollo de *Potamogeton sp.*, cuando el totoral es muy denso (más de 50 tallos por m<sup>2</sup>) o

de *Elodea sp.* y *Chara sp.* cuando el totoral es intensamente explotado o intervenido (Iltis and Mourguiart 1991; Raynal-Roques 1991).

A partir del límite externo del cinturón de totoras, entre los 4 y 7,5 metros de profundidad, se encuentra el tercer sector, donde la especie predominante casi por completo es la *Chara sp.* (Iltis and Mourguiart 1991). Characeae es el grupo más abundante, llegando a ocupar una tercera parte de la superficie vegetal total del Lago (más del 60% en el Lago Menor) (Collot, Koriyama et al. 1983; Guerlesquin 1991). Esto, sin embargo, debe ser nuevamente revisado ya que cambios recientes parecen haber alterado la distribución y abundancia de los grupos.

La cuarta etapa comprende la zona profunda entre los 7,5 y 9,5 metros de profundidad, ocupada por *Potamogeton sp.* y ocasionalmente por *Zannichellia sp.*, siendo esta última etapa considerada como el límite para el desarrollo de la vegetación en el lago Titicaca (Iltis and Mourguiart 1991; Raynal-Roques 1991).

En ciertas zonas del lago donde está presente la contaminación y los procesos de eutrofización, como la Bahía de Puno (Perú) y de Cohana (Bolivia), es común la presencia de dos tipos de macrófitas flotantes invasoras: *Lemna sp.* y *Azolla sp.* (Fontúrbel 2008).

#### **1.2.4. Fitoplancton**

El fitoplancton del lago ha sido estudiado y caracterizado por múltiples autores a lo largo del siglo XX (Frenguelli 1937; Lazzaro 1981; Servant-Vildary 1991; Iltis 1991a; Iltis 1991b), todos los cuales apuntan al hecho de que el lago posee una composición florísticamente pobre si se considera la extensión y variedad del ecosistema, con 85 géneros y 198 especies descritas, de las cuales las clorófitas son las más diversas y las más abundantes (Cadima, Fernández et al. 2005).

#### **1.3. La Bahía de Cohana**

Bahía Cohana se encuentra ubicada en la zona central del lago menor, sobre la ribera oriental (**Fig. 1.2**), a una altitud de 3843 m.s.n.m y con coordenadas geográficas referenciales de 536309 E y 8189998 N (UTM/UPS 19) (Fontúrbel 2005a). Es parte de los municipios de Puerto Perez y Pucarani, en la provincia Los Andes del departamento de La Paz (Ribera 2008). Esta bahía representa la culminación y desembocadura del Río Katari (Montes de Oca 2005), el cual comprende la confluencia final de varios ríos (**Fig. 1.2**), de los cuales el más importante es el Río Pallina (Ribera 2008; Ribera 2010).

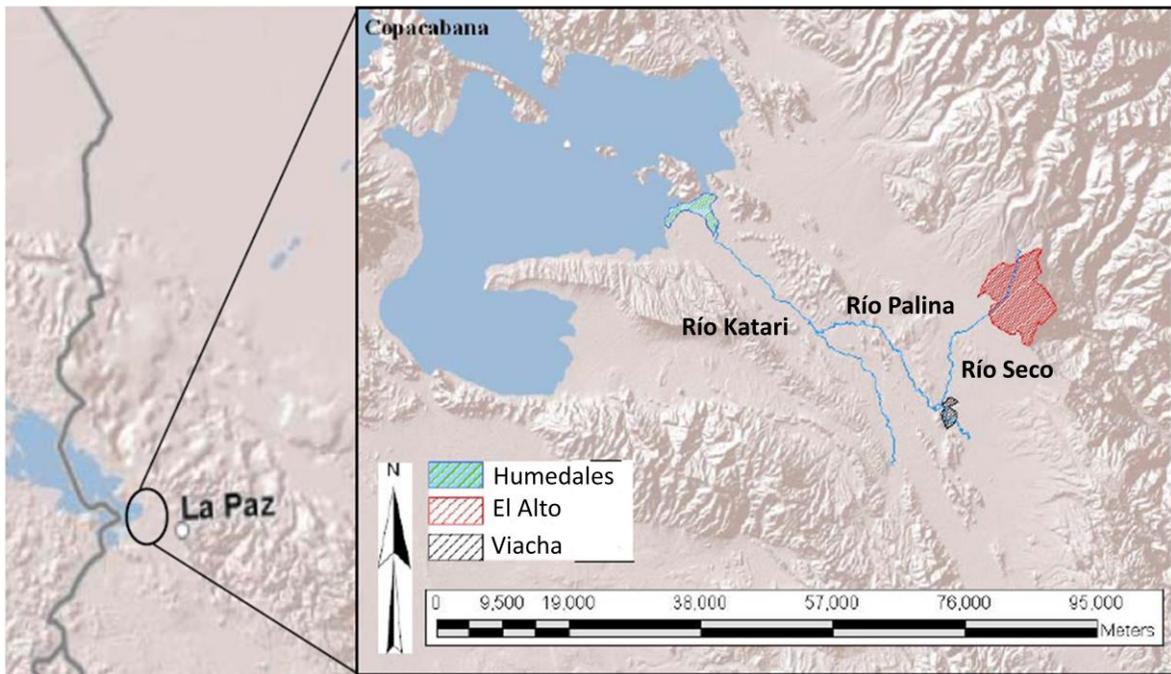


Figura 1.2.- Ubicación de la Bahía de Cohana en el Lago Menor. Tomado de Chudnoff (2009).

La principal actividad económica y productiva de Bahía Cohana es la cría de ganado, siendo la de bovinos la que se realiza de manera intensiva (Fontúrbel 2008). Debido a la limitada vegetación y capacidades cultivables del suelo, la extracción de macrófitas del lago (*S. californicus* y *Myriophyllum sp.* principalmente) se realiza de manera intensiva y constituye el principal recurso forrajero para cubrir la demanda de alimento del ganado (Fontúrbel 2005c). Aunque en menor medida, el cultivo de especies nativas como la quínoa (*Chenopodium quinoa*), la papa (*Solanum andigenum*) y la cebada (*Hordeum vulgare*) representa también una actividad económica de la zona (Fontúrbel 2005c).

#### **1.4. La eutrofización**

La eutrofización es un concepto con múltiples definiciones. Nuestra comprensión acerca de este tema ha cambiado considerablemente desde que, en 1907, el término fuera propuesto por primera vez (Schindler 2006). En la actualidad, sin embargo, la eutrofización es entendida concretamente como “el incremento en la proporción o cantidad del suministro de nutrientes a un ecosistema” (Nixon 1995). Esta definición es particularmente útil porque delimita con claridad el fenómeno propio de la eutrofización como un *proceso* (Hutchinson 1973) y lo diferencia de las causas y consecuencias que dicho fenómeno puede generar.

Es bien sabido que la presencia y concentración de los nutrientes en el ambiente es determinante y limita el desarrollo de los productores primarios (von Liebig 1855). En este sentido, el fósforo (P) y el nitrógeno (N) son los nutrientes inorgánicos principales que actúan como factores limitantes del desarrollo, tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos (Vitousek and Howarth 1991). Debido a esto, el incremento en el suministro de nutrientes a los cuerpos de agua genera un rápido incremento en la producción primaria (Smith 1998), lo que desencadena una secuencia de eventos comunes en todos los procesos eutróficos, los cuales tienen efectos negativos y degradan la calidad hídrica y ecológica de los ecosistemas acuáticos (Smith and Schindler 2009).

La eutrofización, como consecuencia de diversas actividades humanas (eutrofización cultural), viene desarrollándose a lo largo del siglo XX, pero sus efectos y consecuencias no fueron reconocidos sino hasta mediados del siglo pasado (Schindler 2006). Aunque se especulaba la relación entre los nutrientes y una excesiva proliferación de los productores primarios, no se sabía con certeza cuál de todos los elementos (C, N, P) eran primordiales para el desarrollo del proceso eutrófico (Smith, Joye et al. 2006). Los experimentos realizados a nivel ecosistémico en los lagos 226 (Schindler 1974) y 227 (Schindler, Armstrong et al. 1971; Schindler, Kling et al. 1973) en el Área de Lagos Experimentales en Canadá, demostraron de manera contundente el rol preponderante del fósforo en el desarrollo de los procesos eutróficos en lagos (Schindler 1977). A partir de estos trabajos, muchos países industrializados generaron políticas ambientales de reducción y control en

las emisiones de fósforo hacia los ecosistemas de agua dulce, y por extensión, a los de agua salada (Schindler 2006; Smith, Joye et al. 2006).

Sin embargo, en las décadas posteriores, esta hipótesis se vio cuestionada principalmente en estuarios y ecosistemas oceánicos costeros (Howarth and Marino 2006). Esto debido principalmente al hecho de que el incremento continuo de fósforo a los ecosistemas acuáticos puede producir un cambio hacia la limitación por nitrógeno (Howarth, Jensen et al. 1995). En la actualidad, el consenso general, aunque no libre de debate (Schindler, Hecky et al. 2008; Bryhn and Hakanson 2009; Conley, Paerl et al. 2009; Jacoby and Frazer 2009; Schelske 2009; Schindler and Hecky 2009), es que el nitrógeno también juega un rol importante como factor limitante en el desarrollo de la productividad primaria en determinados ecosistemas acuáticos (Howarth and Marino 2006).

Aún más, se ha observado que el fitoplancton muestra una relación positiva con el enriquecimiento de fósforo y nitrógeno (Smith 2006), sugiriendo que ambos pueden ser los factores limitantes y regular a su vez, la productividad primaria y la eutrofización en lagos y ecosistemas costeros marinos (Smith, Joye et al. 2006). Reconocer al nitrógeno como un factor determinante en procesos eutróficos viene también de las experiencias, hasta cierto punto exitosas, de manejar los ecosistemas afectados sólo a través de la reducción del fósforo (Conley, Paerl et al. 2009).

#### **1.4.1. Efectos de la eutrofización**

En la actualidad, la eutrofización es un problema de proporciones y alcances globales (Smith 2006), afectando ecosistemas costeros, océanos y cuerpos de agua dulce por igual, aunque en diferente proporción (Smith, Joye et al. 2006). Su presencia casi ubicua en regiones en contacto directo o indirecto con poblaciones humanas la han convertido en la primera problemática sobre calidad hídrica a nivel mundial (Smith and Schindler 2009). Un resumen de todos los efectos que la eutrofización genera en los ecosistemas acuáticos se encuentra en Smith (2003) y Smith and Schindler (2009).

El primer efecto y uno de los más persistentes en procesos eutróficos, es el cambio en la composición y estructura de las comunidades biológicas (Smith, Joye et al. 2006). Esta primera etapa es importante ya que son los organismos vivos, en gran medida, los que modulan drásticamente el ciclo biogeoquímico de los elementos y en consecuencia son fundamentales para el entendimiento y manejo de la eutrofización (Schindler 2006), así como del destino de otros contaminantes que puedan estar presentes en el agua (Skei, Larsson et al. 2000; Smith and Schindler 2009). En efecto, se observa una modificación del balance competitivo entre los productores primarios (Mainstone and Parr 2002), dando ventaja a los que son pelágicos sobre los que son bentónicos o se encuentran sumergidos (Vadeboncoeur, Jeppesen et al. 2003). Esto implica una transición de un estado de aguas

claras, generalmente dominadas por macrófitas, hacia aguas más turbias dominadas por el fitoplancton suspendido en la columna de agua (Hilton, O'Hare et al. 2006).

Este rápido desarrollo puede desembocar en una excesiva proliferación de floraciones algales (Heisler, Glibert et al. 2008), las cuales son uno de los síntomas más problemáticos. Tal fenómeno trae consigo varios riesgos y amenazas para el ecosistema y la salud humana (Glibert, Anderson et al. 2005; Backer and McGillicuddy Jr. 2006), además de altos costos en temas de remediación o tratamiento de aguas (Mainstone and Parr 2002).

Aunque la eutrofización puede ocurrir naturalmente (Anderson, Glibert et al. 2002), está claro que el enriquecimiento antropogénico de las aguas superficiales es un serio promotor del desarrollo y la persistencia de las floraciones algales (Heisler, Glibert et al. 2008), las cuales pueden ser particularmente dañinas (Paerl and Otten 2013), al producir metabolitos secundarios que resultan muy tóxicos para otros organismos, especialmente mamíferos (Chorus and Bartram 1999; Anderson, Glibert et al. 2002). Además, muchos de los géneros involucrados en floraciones algales presentan adaptaciones que les permiten maximizar el aprovechamiento de nutrientes durante procesos de enriquecimiento periódico o crónico, reforzando considerablemente el ciclo de la eutrofización (Flores and Herrero 2005; Huisman, Matthijs et al. 2005).

La rápida aparición de eventos de floración produce, además, efectos visibles y duraderos en los ecosistemas acuáticos. En primer lugar, la descomposición bacteriana del excesivo fitoplancton senescente, termina por agotar el oxígeno, generando eventos letales de hipoxia o anoxia para peces, anfibios e invertebrados (Paerl and Otten 2013). En segundo lugar, si las concentraciones de oxígeno son muy bajas y la hipoxia en el fondo es permanente, los sedimentos pierden su capacidad de retener el fósforo (Sondergaard, Jensen et al. 2001). La ausencia de macrófitas o plantas bentónicas que controlen la re-suspensión de partículas, también promueve la liberación del fósforo inmovilizado en los sedimentos (Kemp, Boynton et al. 2005). Ambos procesos estimulan un nuevo evento de proliferación de algas en la superficie (en su mayoría cianobacterias), con lo que el ciclo eutrófico se retroalimenta y persiste (Vahtera, Conley et al. 2007).

#### **1.4.2. Eutrofización en la Bahía de Cohana**

La Bahía de Cohana es el sitio que presenta el estado más avanzado de eutrofización en todo el lado boliviano del lago Titicaca (Ribera 2008). Tanto el río Katari como el Pallina están siendo impactados por actividades antropogénicas y son receptores tanto de descargas puntuales provenientes de la red de alcantarillado -con tratamiento parcial o sin él-, como de infiltraciones no puntuales en zonas carentes de red de recolección de aguas servidas (Chiqui 2001; Chudnoff 2009; Ribera 2010). Dichas descargas incluyen aguas residuales domésticas, lixiviados, desechos sólidos, industriales, mineros y hospitalarios provenientes

de ciudades y comunidades como El Alto, Viacha, Laja, Pucarani y Batallas (Ribera 2008). Según los parámetros de la Ley boliviana 1333 del Medio Ambiente, Bahía Cohana tiene una calidad de agua mínima (categoría D) y no es apta para uso humano, riego u otras actividades productivas (Fontúrbel 2005a).

Aunque se han realizado estudios sobre la eutrofización en Bahía Cohana y otros sitios como Copacabana y Huatajata (Fontúrbel 2003; Fontúrbel 2005a; Fontúrbel 2005b; Fontúrbel, Molina et al. 2006; Fontúrbel 2008), éstos son todavía escasos y presentan algunas limitaciones. En primer lugar, los estudios son muy localizados, de naturaleza fuertemente apreciativa y en muchos casos carecen de un análisis profundo. En segundo lugar, los parámetros utilizados (macrófitas, fitoplancton, propiedades organolépticas, análisis físico-químicos) no permiten, por si solos, observar etapas tempranas de eutrofización antes de que el medio presente alteraciones marcadas y mucho menos permiten observar la distribución y el alcance espacial del proceso eutrófico.

### **1.5. Isótopos estables**

Un isótopo de un elemento dado es un átomo de dicho elemento que presenta en su núcleo el mismo número de protones, pero diferente número de neutrones (Hoefs 2009). Particularmente, los isótopos estables (a diferencia de los radiactivos que son intrínsecamente inestables) son aquellos que permanecen energéticamente estables, sin decaer ni emitir radiación (Sulzman 2007). Se han encontrado alrededor de 300 isótopos estables de vida libre en la naturaleza, además de 1200 de sus pares radioactivos y sólo 21 elementos “puros” que no poseen más de un isótopo (Sulzman 2007; Hoefs 2009).

Desde su postulación en 1913 y la posterior confirmación de su existencia en 1922 por los químicos F. Soddy y F. Aston respectivamente (Nobelprize.org), los isótopos han cobrado gran relevancia en el ámbito práctico como instrumentos útiles para dilucidar cuestiones básicas a toda escala (Michener and Lajtha 2007). Gracias a mejoras tecnológicas y reducciones en los costos de análisis, el estudio de los isótopos se ha diversificado a otras ramas científicas lejos del campo inicial de donde surgió, convirtiéndola en una herramienta habitual para estimar tasas, deducir procesos, evaluar modelos, e identificar fuentes y contribuciones, tanto a nivel molecular y de organismos como a nivel ecosistémico (Sulzman 2007).

En la naturaleza, los isótopos livianos para los elementos de interés biológico como el H, C, N y O son mucho más abundantes que los pesados. A razón de esto, las diferencias isotópicas entre distintos materiales (ej: hojas, animales, suelo) son extremadamente pequeñas, siendo observadas recién en el tercer o cuarto dígito significativo (Schoeller 1999), por lo que representar la composición isotópica en forma de fracción no resulta útil. Debido a esto, la composición isotópica es reportada como la variación relativa ( $\delta$ ) de la

proporción del isótopo pesado en relación al liviano respecto a un estándar internacional, usando la notación por mil (‰) (Sulzman 2007). En este sentido, los valores de  $\delta$  (“delta”) equivalen a diez veces la diferencia porcentual de la proporción isotópica de la muestra en relación al estándar (Schoeller 1999).

### 1.5.1. Fraccionamiento isotópico

Las variaciones en masa existentes entre isótopos del mismo elemento llevan a *efectos isotópicos*, los cuales alteran las propiedades físicas y químicas de los átomos (Hoefs 2009). Debido a que los electrones de la capa más externa de un átomo cualquiera son los que determinan todas las reacciones químicas posibles, el comportamiento químico entre dos isótopos del mismo elemento es cualitativamente idéntico (Sulzman 2007). Sin embargo, la masa atómica también determina la energía vibracional de cada átomo. En consecuencia, los átomos “pesados” vibran más lento, ya que poseen menor energía vibracional y por tanto forman enlaces más estables y fuertes (Sulzman 2007). En segundo lugar, las diferencias en masa, aunque mínimas, tienen un efecto sobre la velocidad de movimiento o reacción de un átomo o molécula, por lo que a mayor masa, menor será la velocidad de movimiento o reacción (Craig 1953). Debido a todo esto, el comportamiento físico entre dos isótopos del mismo elemento es cuantitativamente diferente (Sulzman 2007).

Estas diferencias de velocidad y de estabilidad de los enlaces producen variaciones en la abundancia isotópica entre la fuente y el producto durante las transformaciones químicas, fenómeno que se ha venido a denominar como *fraccionamiento* (Sulzman 2007; Hoefs 2009). A su vez, el resultado de las transformaciones químicas debido al proceso de fraccionamiento genera un enriquecimiento o empobrecimiento del isótopo “pesado” respecto al “ligero” (o viceversa) en el producto, en comparación a la fuente o reactivo inicial (Sulzman 2007). La composición isotópica se expresa según la desviación en partes por mil (‰) de una muestra cualquiera respecto a un estándar internacional ( $N_2$  atmosférico para el nitrógeno y VPDB para el carbono), siguiendo la notación:

$$\delta(\text{‰}) = \left( \frac{R_{\text{muestra}} - R_{\text{estándar}}}{R_{\text{estándar}}} \right) * 1000$$

(ec. 1)

### 1.5.2. Medición

La composición isotópica es determinada típicamente mediante la técnica de espectrometría de masa de relación isotópica (IRMS, por sus siglas en inglés) (Michener and Lajtha 2007). Esta técnica separa átomos o moléculas cargadas en función de la proporción masa/carga ( $m/z$ ) que estas presenten (Sulzman 2007). Las muestras son introducidas en el equipo en forma de gas, a través de tubos capilares, los cuales aseguran una dinámica de flujo viscoso y evitan cualquier posible fraccionamiento (Sulzman 2007). Una vez dentro, la muestra gaseosa es primeramente ionizada (al atravesar un haz de electrones) y posteriormente acelerada para recorrer un tubo de vuelo, donde un campo magnético perpendicular a la trayectoria de vuelo dobla el haz ionizado (Dawson and Brooks 2001). El haz de isotopos livianos se curva mucho más que el de los isótopos pesados, debido a que el radio de la curvatura es proporcional a la raíz cuadrada de la proporción masa/carga (Sulzman 2007). Un detector de iones al final del tubo de vuelo recibe los patrones de vuelo y transforma las señales en voltaje (Dawson and Brooks 2001). Finalmente, un sistema computacional puede traducir las señales eléctricas relativas en proporciones isotópicas y relacionarlas con la del estándar internacional para obtener valores de delta ( $\delta$ ) (Dawson and Brooks 2001).

### 1.5.3. Isótopos de nitrógeno

Se ha observado que el fraccionamiento de los isótopos de nitrógeno ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ;  $\delta^{15}\text{N}$ ) a medida que se asciende los niveles tróficos genera un enriquecimiento progresivo de alrededor de 3,4 ‰ respecto al nivel inferior (Minagawa and Wada 1984; Vander Zanden and Rasmussen 2001). Esta variación relativamente constante en la composición isotópica de N permite determinar la posición de un determinado individuo en la cadena trófica (Cabana and Rasmussen 1996; Vander Zanden and Rasmussen 1999).

De esta manera, el nitrógeno originado a partir de desechos y afluentes humanos es materia fecal que se origina en un nivel trófico alto, por lo que posee una composición isotópica particularmente enriquecida en  $^{15}\text{N}$ , en comparación con el N que proviene de otras fuentes, ambos de los cuales están disponibles de entrar en los ecosistemas (ver *Ciclo del nitrógeno*, anexo A-1 y A-3) e integrarse en las redes tróficas (McClelland, Valiela et al. 1997). Otros procesos como la nitrificación y volatilización del  $\text{NH}_4^+$  o la denitrificación del  $\text{NO}_3^-$  durante las transformaciones químicas de los desechos y afluentes generan también un enriquecimiento del  $\delta^{15}\text{N}$  (Mariotti, Germon et al. 1981). En contraste, los fertilizantes producidos sintéticamente a través del proceso Haber-Bosch (ver *Alteraciones al ciclo del nitrógeno*, Anexo A-2) presentan una composición isotópica muy empobrecida, debido a que, durante dicho proceso, el nitrógeno es fijado de la atmósfera, el cual presenta un  $\delta^{15}\text{N}$  igual a 0 (Heaton 1986).

#### 1.5.4. Isótopos de carbono

Por su parte, la composición de isótopos de carbono ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ :  $\delta^{13}\text{C}$ ) permite determinar flujos de energía, así como la dieta y la fuente de donde los organismos obtienen el carbono (DeNiro and Epstein 1978) debido a que se ha observado que el  $\delta^{13}\text{C}$ , a diferencia del  $\delta^{15}\text{N}$ , presenta una variación mínima (de alrededor de 0.8‰) a medida que se avanza en el nivel trófico (Peterson and Fry 1987; Vander Zanden and Rasmussen 2001). Aún más, es posible utilizar el  $\delta^{13}\text{C}$  de los productores primarios para discriminar entre el carbono que se origina en la tierra (carbono alóctono) del que se genera de manera “local” (carbono autóctono) en los ecosistemas acuáticos (Pierson-Wickmann, Gruau et al. 2011). Esta discriminación es posible debido a que por lo general, el  $\delta^{13}\text{C}$  de la producción primaria terrestre presenta valores significativamente diferentes a los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  observados para la producción primaria acuática (Boutton 1996; Fry 2006; Marshall, Brooks et al. 2007).

La explicación reside en el hecho de que las plantas terrestres tienen como única fuente de C al  $\text{CO}_2$  de la atmósfera, el cual tiene un  $\delta^{13}\text{C}$  muy constante, de alrededor de -8 ‰ (Marshall, Brooks et al. 2007). En consecuencia, la composición isotópica de las plantas terrestres está determinada por el  $\delta^{13}\text{C}$  de la fuente de carbono ( $\text{CO}_2$ ) más una cantidad variable de fraccionamiento ( $\epsilon$ ) asociada mayoritariamente a diferencias fisiológicas y de vías metabólicas durante el proceso fotosintético (Marshall, Brooks et al. 2007). En este sentido, se han observado valores medios de -27 ‰ para plantas con metabolismo C3 y de -14 ‰ para plantas de metabolismo C4 y CAM (Fry 2006).

Por su parte, las plantas acuáticas asimilan el carbono que necesitan a partir de diversas formas orgánicas disueltas (CID), las cuales incluyen carbonatos y  $\text{CO}_2$  disuelto (Fry 2006). A diferencia del  $\text{CO}_2$  atmosférico, el  $\delta^{13}\text{C}$  del carbono inorgánico disuelto (CID) es muy variable y está directamente relacionado a factores físicos y procesos biológicos del ambiente que lo determinan (Finlay 2003; Parker, Poulson et al. 2010). En consecuencia, se ha observado que la producción primaria acuática (basada en metabolismo C3) genera valores de  $\delta^{13}\text{C}$  considerablemente más enriquecidos a los observados para la fotosíntesis terrestre (Fry 2006).

De esta manera, la aplicación práctica de los isótopos estables de carbono y nitrógeno permiten ampliar el conocimiento que se tiene sobre los ecosistemas acuáticos, al superar ciertas limitaciones existentes -como la alta complejidad espacial, la dificultad para realizar observaciones directas o las diversas fuentes y aportes de nutrientes- al momento de estudiar estos ecosistemas (Finlay and Kendall 2007). En efecto, la eutrofización es una de las áreas en las que el uso de métodos que aprovechen la abundancia de los isótopos estables en el medio ambiente han generado diversas aplicaciones (Finlay and Kendall 2007; Kendall, Elliot et al. 2007), como el poder rastrear la fuente de donde vienen los

nutrientes y relacionarla con procesos o actividades específicas (McClelland and Valiela 1998; Savage and Elmgren 2004; Singleton, Woods et al. 2005).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General. -**

- Evaluar la composición de isótopos estables de carbono y nitrógeno en cuatro compartimientos de Bahía Cohana (macrófitas, materia orgánica particulada, sedimento y perifiton) como marcadores de enriquecimiento orgánico para determinar procesos de eutrofización incipiente en el lago menor del Lago Titicaca.

### **2.2. Objetivos específicos. -**

- Determinar el fraccionamiento isotópico de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en macrófitas, materia orgánica particulada (MOP), sedimento y perifiton, siguiendo un gradiente de eutrofización en Bahía Cohana.
- Determinar el enriquecimiento de nitrógeno.
- Determinar el enriquecimiento y origen del carbono.
- Determinar el gradiente de eutrofización a través del análisis físico-químico del agua y corroborar la eficacia de los marcadores isotópicos.
- Determinar el alcance de la eutrofización en Bahía Cohana.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudio

La Bahía de Cohana es una zona somera con alrededor de 3 metros de profundidad, caracterizada por extensos totorales (Roberts and Villegas 2007). Dependiendo del nivel que alcance el agua, la parte superior de la bahía está formada por un pequeño archipiélago o península montañosa, el cual comprende planicies semi-colmatadas y fácilmente inundables (Ribera 2008).

Su afluente principal es el Río Katari, el cual recorre 90 km desde su origen, atravesando zonas urbanas relativamente pobladas y campos de cultivo que se van haciendo más frecuentes a medida que se aproxima al lago (Roberts and Villegas 2007; Chudnoff 2009). Durante la época seca, Bahía Cohana se comunica y recibe directamente la descarga del Katari, cuando los niveles de agua son bajos (Chudnoff 2009). Durante la época húmeda en cambio, el incremento de caudal y posterior desborde del Katari forma una planicie de inundación en la llanura aluvial antes de llegar al lago (**Fig. 3.1**) (Chudnoff 2009; Ribera 2010).

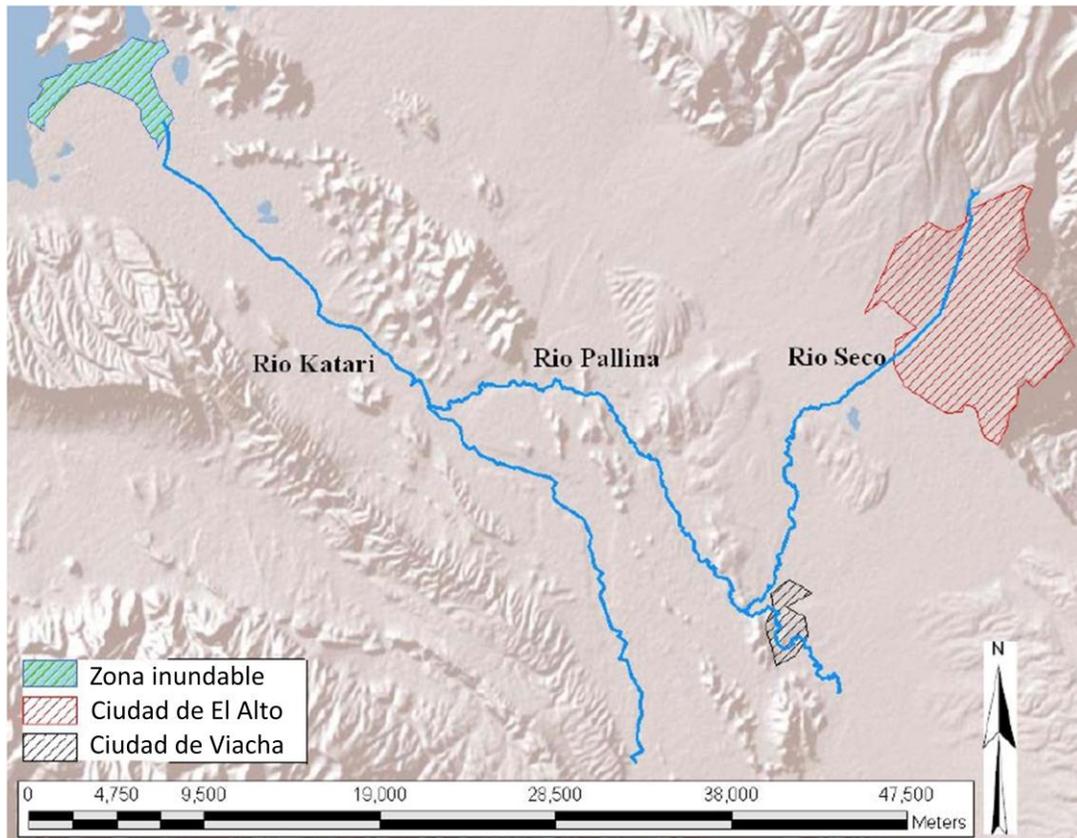


Figura 3.1- Principales tributarios de la Bahía de Cohana. Tomado de Chudnoff (2009).

### 3.2. Toma de muestras

Se realizaron dos viajes, durante los meses de abril y septiembre de 2013 a Bahía Cohana y sus alrededores. Específicamente, el muestreo se llevó a cabo los días 10 y 11 de abril y 24 y 25 de septiembre de 2013, al final de la época húmeda y seca respectivamente. Se escogieron cinco puntos de muestreo dentro de la bahía y uno fuera, partiendo de la salida del Río Katari y continuando hacia el interior de la misma. La elección de los sitios de muestreo se realizó en función de un gradiente de eutrofización establecido a través de los datos de Carbono Orgánico Disuelto (COD). Se escogieron dos sitios de muestreo como controles ubicados fuera de Bahía Cohana, en la bahía superior de la zona de Quehuaya y otros adicionales en Huatajata, Chua, y el estrecho de Tiquina (**Fig. 3.2**).

En cada punto dentro de la bahía se obtuvieron muestras de macrófitas, perifiton, sedimentos y materia orgánica particulada (MOP). En el resto de los sitios fuera de Bahía Cohana las muestras fueron colectadas en función del acceso y disponibilidad física para colectarlas. Todas las muestras fueron recogidas con guantes de nitrilo sin talco (Kimberly-Clark KC500), debidamente etiquetadas y puestas al congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en bolsas individuales, para su traslado y posterior tratamiento en laboratorio.



**Figura 3.2-** Puntos de muestreo dentro de Bahía Cohana y en sitios adicionales en el Lago Menor.

### **3.2.1. Macrófitas, perifiton y sedimentos**

Todas las muestras de macrófitas, perifiton y sedimentos fueron colectadas en tubos cónicos de polipropileno (Falcon™) de 50 ml con tapa rosca. En el caso de las macrófitas, se colectaron los géneros *Schoenoplectus californicus* (totora), *Myriophyllum sp.*, *Elodea sp.*, *Chara sp.*, *Stuckenia sp.* y *Zannichellia sp.* Fueron colectadas manualmente en el caso de las macrófitas emergentes como *S. californicus* o cuando éstas se encontraban cerca de la superficie. En los sitios más profundos, la recolección de *Chara sp.*, *Stuckenia sp.* y *Zannichellia sp.* se realizó mediante draga.

En el caso del perifiton, solamente se colectaron muestras asociadas a *S. californicus* y *Chara sp.*, debido que sólo en estas macrófitas se encontraba una cantidad suficientemente abundante que pudo permitir el muestreo. La recolección se realizó mediante el raspado con los dedos (siempre con el uso de guantes) o con una espátula de plástico para introducirlos en sus respectivos tubos.

Los sedimentos fueron obtenidos a través de un recolector de sedimentos cilíndrico de plástico. Una vez extraída la columna de sedimento, se procedió a colectar el sedimento superficial (0-10 cm) con una espátula de plástico.

### **3.2.2. Materia orgánica particulada (MOP)**

Las muestras de agua para MOP fueron colectadas mediante una botella Van Dorn a la profundidad donde se registró el máximo de clorofila. Las muestras de aguas fueron captadas en recipientes plásticos para su filtración en tierra, previa tamización con red de zooplancton para extraer todos los moluscos y crustáceos.

Una vez en tierra, se procedió a la filtración (2 litros por punto) de las muestras mediante un sistema de filtración conectado a una bomba de vacío. Los filtros utilizados fueron de micro-fibra de vidrio grado GF/F (borosilicate glass; Whatman®) de 47 mm de diámetro y 0.7 µm de poro, previamente quemados en mufla a 450 °C durante dos horas. Una vez utilizados, cada filtro fue colocado individualmente en un soporte plástico con tapa, debidamente etiquetado, embolsado y colocado en el congelador a -20°C.

### **3.3. Tratamiento y preparación de las muestras**

La preparación de las muestras para análisis isotópico fue realizada en el Laboratorio de Calidad Ambiental (LCA) de la UMSA, siguiendo los protocolos establecidos por el laboratorio LIENSs de la Universidad de la Rochelle en Francia ([http://lienss.univ-larochelle.fr/IMG/pdf/psi\\_lienss\\_annexe\\_2\\_protocoles\\_v3-8.pdf](http://lienss.univ-larochelle.fr/IMG/pdf/psi_lienss_annexe_2_protocoles_v3-8.pdf)).

Para el caso de las muestras de macrófitas, perifiton y sedimentos se procedió a liofilizarlas durante 48 o 72 horas, en función de la cantidad de agua presente en cada muestra. Una vez extraída toda el agua, las muestras de macrófitas y perifiton fueron trituradas con un molidor eléctrico de aspas. En el caso del sedimento, se utilizó un mortero de cerámica para dicha tarea. En ambos casos, las muestras fueron reducidas a un polvo fino.

El proceso de eliminación de agua en los filtros de vidrio (GF/F) se realizó mediante un proceso de secado en estufa a 42 °C, sin extracción de aire, durante 24 horas. Posteriormente fueron almacenados con gel de sílice, para evitar cualquier acumulación de humedad.

### **3.3.1. Encapsulado**

Una vez reducidas a un fino polvo, se procedió a colocar aproximadamente 0.7 mg de cada muestra en cápsulas de estaño de peso estándar (Elemental Microanalysis) de 5 mm de diámetro por 8 mm de alto. En el caso de los filtros, se procedió a raspar la muestra con una espátula metálica hasta conseguir el mismo peso deseado, evitando rasgar el filtro e introducir partes de éste en la cápsula. Una vez cerradas y reducidas a una forma esférica, las cápsulas con muestra fueron almacenadas en placas de inmuno-ensayo (matriz de 8 x 12) de 96 pozos (Thermo Scientific™).

### **3.4. Análisis isotópico**

Todas las muestras (macrófitas, perifiton, sedimentos y materia orgánica particulada) fueron enviadas para su análisis al laboratorio LIENSs de la Universidad de La Rochelle en Francia. La composición isotópica fue determinada mediante un espectrómetro de masas de relación isotópica de flujo continuo (CF-IRMS) Delta V Plus (Thermo Scientific, Brême, Alemania) con interface universal ConFlo IV y autosampler ZeroBlank (Costech, Milán, Italia), previa combustión completa de las muestras en un analizador elemental (EA) Flash EA1112 (Thermo Scientific, Milán, Italia). La precisión analítica fue menor a 0.15 ‰ para el carbono (CO<sub>2</sub>) y menor a 0.20 ‰ para el nitrógeno (N<sub>2</sub>).

La composición isotópica fue reportada en relación a los estándares internacionales para carbono (Viena Pee Dee Belemnite – VPDB) y nitrógeno (aire) respectivamente. Los datos fueron expresados según la desviación en partes por mil (‰) de los respectivos estándares siguiendo la notación para composición isotópica ( $\delta$ ) (ver ecuación 1).

### **3.5. Físico-química del agua**

#### **3.5.1. Carbono Orgánico Disuelto (COD)**

En cada punto, se obtuvieron muestras de agua en el máximo de clorofila mediante una botella Van Dorn. De ésta, 40 ml fueron filtrados mediante filtros Steriver Cartridge cut-off nominal de 0.45µm y posteriormente acidificados con 1% v/v de ácido clorhídrico (HCl) de grado súper puro en tubos de borosilicato. Las muestras fueron enviadas para su análisis al Instituto de Ciencias de la Tierra (ISTerre) de la Universidad Joseph Fourier (Grenoble) en Francia. Se determinó la concentración de COD en las muestras mediante un espectrómetro infrarrojo no dispersivo de CO<sub>2</sub> (NDIR, Shimadzu®) previa oxidación húmeda de las muestras en una solución de persulfato de sodio a 100 °C. La precisión de los análisis fue comprobada mediante el estándar CRM MISSISSIPPI-03 (Environment Canada). El límite de detección (SD = 3) fue de 0.2 mg/L.

#### **3.5.2. Datos físicoquímicos**

En cada sitio y paralelamente a la toma de muestras, se realizaron mediciones *in situ* de las características físico-químicas del agua mediante una sonda multiparámetro Hanna HI 98280, obteniéndose perfiles de profundidad a lo largo de toda la columna del agua. Los parámetros tomados en consideración fueron: pH, temperatura, potencial redox (ORP), O<sub>2</sub> disuelto (DO), conductividad eléctrica (EC), salinidad y sólidos totales (TDS).

### **3.6. Análisis estadísticos**

Todas las correlaciones de las composiciones isotópicas y de los parámetros físico-químicos se evaluaron mediante la prueba de correlación de Pearson con un 95% de confianza mediante el programa Sigma Plot 11.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. Físicoquímica del agua

#### 4.1.1. Carbono Orgánico Disuelto (COD)

Los datos de carbono orgánico disuelto (COD) en el agua para abril y septiembre (época húmeda y seca, respectivamente) muestran un patrón de disminución similar respecto a la distancia, aunque con una diferencia observable entre las dos épocas en los puntos próximos a la desembocadura del río Katari (**Anexo B, Fig. 1**).

Durante la época húmeda, el COD disminuye de 6.5 miligramos por litro cerca de la desembocadura del río hasta llegar a 4.9 miligramos por litro dentro de la bahía, a 12 kilómetros de distancia de la costa (**Anexo B, Fig. 1a**). Durante la época seca, el gradiente de disminución es considerablemente mayor, con concentraciones de 23.1 miligramos por litro próximas a la desembocadura del río y que disminuyen hasta alcanzar valores de 4.9 miligramos por litro a 14 kilómetros de distancia de la costa (**Anexo B, Fig. 1b**). Esta marcada variación estacional, reflejada por la disminución de 1.6 mg/L y 18.2 mg/L para la época húmeda y seca, respectivamente, puede explicarse por el incremento de la precipitación durante la época de lluvias (noviembre a marzo) (Boulangé and Aquize 1981), la cual diluye la concentración de todo el material orgánico que es arrastrado río abajo y que eventualmente termina en Cohana. Por el contrario, durante la época seca (mayo a septiembre) el flujo y arrastre en el Katari es mucho menor, lo que ocasiona una mayor concentración del material orgánico que va a parar a la bahía (Ribera 2008).

En este sentido, la relación entre el COD y la distancia a la desembocadura del Katari resulta significativa tanto para el mes de abril ( $p = 0.04$ ,  $R^2 = 0.803$ ) como para el mes de septiembre ( $p = 0.026$ ,  $R^2 = 0.848$ ). Aún más, cuando los datos de COD de ambas épocas se combinan, la relación respecto a la distancia también resulta significativa (**Anexo B, Fig. 2**). Estos resultados están acordes con el patrón descrito por Stanley, Powers et al. (2012), quienes observan que el incremento en la concentración de COD en los cuerpos de agua está estrechamente relacionado a actividades humanas. Tanto los procesos de urbanización y expansión demográfica (que incrementan la cantidad de COD que es arrastrado por los ríos) (Aitkenhead-Peterson, Steele et al. 2009) como el incremento de nutrientes en ríos y lagos (que estimula la producción primaria e incrementa el COD “local”) (Bade, Carpenter et al. 2007) generan una intensificación de la cantidad del COD en las costas y zonas más próximas a efectos de contaminación antropogénicos.

Por su parte, las concentraciones de COD para los sitios de control C1 y C2 durante el mes de abril fueron de 6.5 y 5.4 mg/L respectivamente, y de 7.8 mg/L en C2 para el mes de septiembre (**Anexo B, tabla 1**). Los valores observados en estos dos sitios pueden

considerarse intermedios, comparados con el gradiente observado en Bahía Cohana para las mismas épocas. Los sitios de control fueron seleccionados por encontrarse fuera de Bahía Cohana y libres de la descarga del Katari. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que los sitios escogidos como controles están siendo a su vez impactados y no pueden ser considerados como libres de perturbaciones antropogénicas. En este sentido, es posible que las pequeñas comunidades asentadas en la Bahía de Quehuaya estén generando un aporte apreciable de materia orgánica que llega en forma constante al lago.

#### **4.1.2. Datos multiparamétricos**

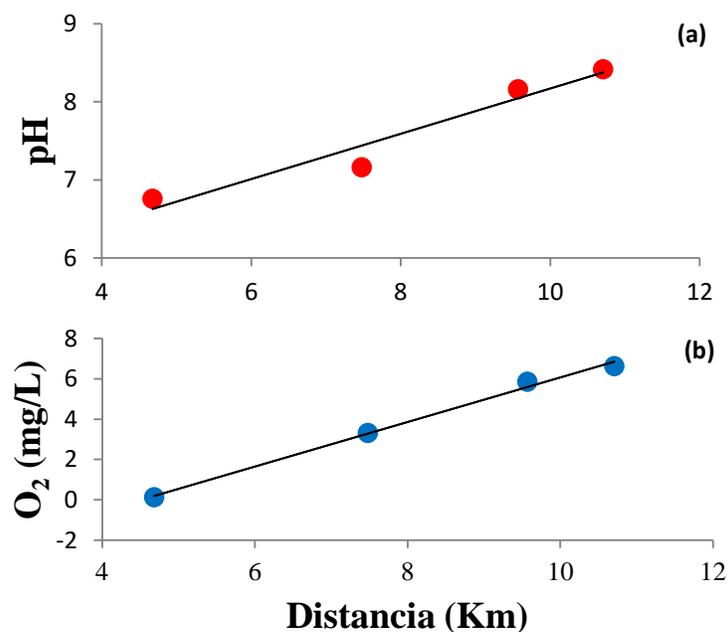
Los datos fisicoquímicos del agua se presentan de forma resumida en la **tabla 4.1**. Todos los parámetros considerados mostraron una fuerte correlación con la distancia (**Anexo B, tabla 2**). Sin embargo, sólo los parámetros de pH y oxígeno disuelto resultaron ser significativos (**Fig. 4.1**). En general, se observa que los valores de los parámetros medidos disminuyen a medida que se incrementa la proximidad a la desembocadura del río. Esto muestra que, comparativamente, las aguas provenientes del Katari están generando, en los ambientes acuáticos más próximos de la bahía, una tendencia hacia condiciones más reductoras (-454.25 mV), ácidas (pH = 6.8) y de hipoxia (0.13 mg/L).

Los datos fisicoquímicos obtenidos para los sitios de control C1 y C2 (**Tabla 4.1**) no permiten establecer una tendencia clara hacia un estado trófico definido. Ambos sitios presentan valores de pH (< 7.7) y oxígeno disuelto (< 5 mg/L) comparativamente diferentes a los observados en el sitio más alejado (a 12 Km) y presumiblemente menos afectado por el efecto antropogénico proveniente del Katari. A su vez, ambos controles presentan características más oxidativas en comparación al sitio ubicado a 4.68 kilómetros de la bahía. Se puede decir entonces, al igual que para el caso de COD, que los sitios escogidos como controles no están libres de la perturbación antropogénica de las comunidades aledañas.

El efecto más común durante los procesos de eutrofización es la reducción en los niveles de oxígeno como resultado de la degradación bacteriana de la materia orgánica que se forma durante la explosión y consecuente senescencia de los productores primarios (Cloern 2001; Heisler, Glibert et al. 2008). La segunda consecuencia que resulta de la oxidación de la materia orgánica es la generación de CO<sub>2</sub>, el cual forma ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al reaccionar con el agua y se disocia finalmente en carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>), bicarbonatos (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e iones de H<sup>+</sup> libres, los cuales bajan el pH y causan la acidificación del agua (Cai, Hu et al. 2011). En consecuencia, se ha observado que en ecosistemas acuáticos eutrofizados, la acidificación y el agotamiento del oxígeno disuelto son ambos fenómenos que coinciden tanto temporal como espacialmente (Cai, Hu et al. 2011; Wallace, Baumann et al. 2014).

**Tabla 4.1:** Datos fisicoquímicos del agua para cada sitio de muestreo en Bahía Cohana para el mes de abril de 2013.

Sitio (Km)	Temp. (°C)	pH	ORP (mV)	O <sub>2</sub> (mg/L)	Cond. (μS/cm)	Salinidad (%)
P1 (10,71)	16,45	8,42	-148,79	6,63	1050,67	0,52
P2 (9,57)	17,47	8,16	-137,40	5,85	958,62	0,48
P3 (7,48)	16,30	7,16	-76,16	3,31	961,80	0,48
P4 (4,68)	12,52	6,76	-454,25	0,13	405,16	0,20
C1 (-)	16,47	7,22	-112,09	2,56	1017,00	0,51
C2 (-)	16,55	7,48	-173,65	4,29	952,75	0,47



**Fig. 4.1.-** Variación del pH y oxígeno disuelto (OD) en relación con la distancia al río Katari. Los datos representan valores medidos a 1.5 metros de profundidad en Bahía Cohana para (a) pH ( $p = 0.03$ ,  $R^2 = 0.942$ ) y (b) oxígeno disuelto ( $p = 0.002$ ,  $R^2 = 0.995$ ).

En este sentido, la relación y los patrones observados para el pH y O<sub>2</sub> disuelto (**Fig. 4.1**) junto con los de COD (**Anexo B, Fig. 2**) muestran claramente un gradiente, con efectos marcados de eutrofización en los sitios próximos a la desembocadura del Katari, y que se van atenuando con la distancia a medida que se va adentrando en la bahía.

Por su parte, la conductividad eléctrica (indicador del contenido de sales disueltas en el agua) registró valores elevados fuera de Bahía Cohana (a 10,71 Km) respecto a los observados en el sitio más próximo a la orilla, a 4.68 Km (**Anexo B, Fig.3**). Mediciones realizadas en Huatajata y Chua revelaron también valores superiores a los 1000 microsiemens por cm ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) (**Anexo B, Fig.3**). Estos resultados están en concordancia con otros trabajos realizados en la cuenca del sistema TDPS, en los que se observa que dicho sistema presenta una tendencia natural al incremento de las sales disueltas (Quintanilla and Quino 2014) y que no está relacionado necesariamente a actividades y efectos antropogénicos.

#### **4.1.3. Nutrientes**

El nitrato es el único que presenta una tendencia de disminución respecto a la distancia, mientras que los valores para nitrito y fosfato resultaron ser uniformes y casi sin variaciones a lo largo de todo el transecto (**Anexo B, Fig.4**).

El gradiente observado para el nitrato va de 5.2 mg/L (a 4 kilómetros de la desembocadura del Katari) a 0.8 mg/L dentro de la bahía (a 12 kilómetros de distancia del río). Esto muestra una disminución de 4.4 mg/L ( $p > 0.05$ ,  $R^2 = 0.785$ ) a lo largo de 8 kilómetros del transecto (**Anexo B, Fig.4**). Por su parte, los datos de nitrito y fosfato permanecieron similares y sin correlación a lo largo de toda la bahía, con valores que se mantuvieron alrededor de 0.16 y 0.21 mg/L respectivamente (**Anexo B, Fig.4**).

Debido a que tanto el nitrógeno como el fósforo pueden ser rápidamente asimilados y ciclados en el ecosistema por bacterias y algas (Tank, Meyer et al. 2000; Liu, Villalba et al. 2008), medir concentraciones de nitratos y fosfatos en el agua puede no resultar muy útil como indicador de algún proceso. Esto puede explicar la razón de porque los datos de nitratos, nitritos y fosfatos no muestran tendencia ni relación alguna en Bahía Cohana, a pesar de que otros datos apuntan claramente a un gradiente de eutrofización.

## 4.2. Isótopos Estables

### 4.2.1. Nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ )

La composición isotópica de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para macrófitas, MOP, sedimentos y perifiton se muestra de forma resumida en la **tabla 4.2**. En todos los casos, el  $\delta^{15}\text{N}$  mostró una tendencia de empobrecimiento con relación a la distancia a la desembocadura del Katari, pero con particularidades en cada caso.

**Tabla 4.2:** Composición isotópica de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en macrófitas, MOP, sedimentos y perifiton para Bahía Cohana (2013).

	Sitios de muestreo (‰)							Sitios Control (‰)	
	L3 (13.6 Km)	P1 (10.7 Km)	P2 (9.6 Km)	P2,5 (8.4 Km)	P3 (7.5 Km)	P4 (4.7 Km)	P5 (1 Km)	C1	C2
<b>Macrófitas*</b>	-0.70	-3.61	-0.29	1.23	2.71	14.70	15.31	-0.51	-0.21
<b>MOP</b>	0.64	1.62	0.34	1.27	3.39	12.20	9.48		0.74
<b>Sedimento</b>		-2.63	-0.68	0.12		1.52	-0.02		0.13
<b>Perifiton</b>			2.14		3.60	10.58		4.37	1.23

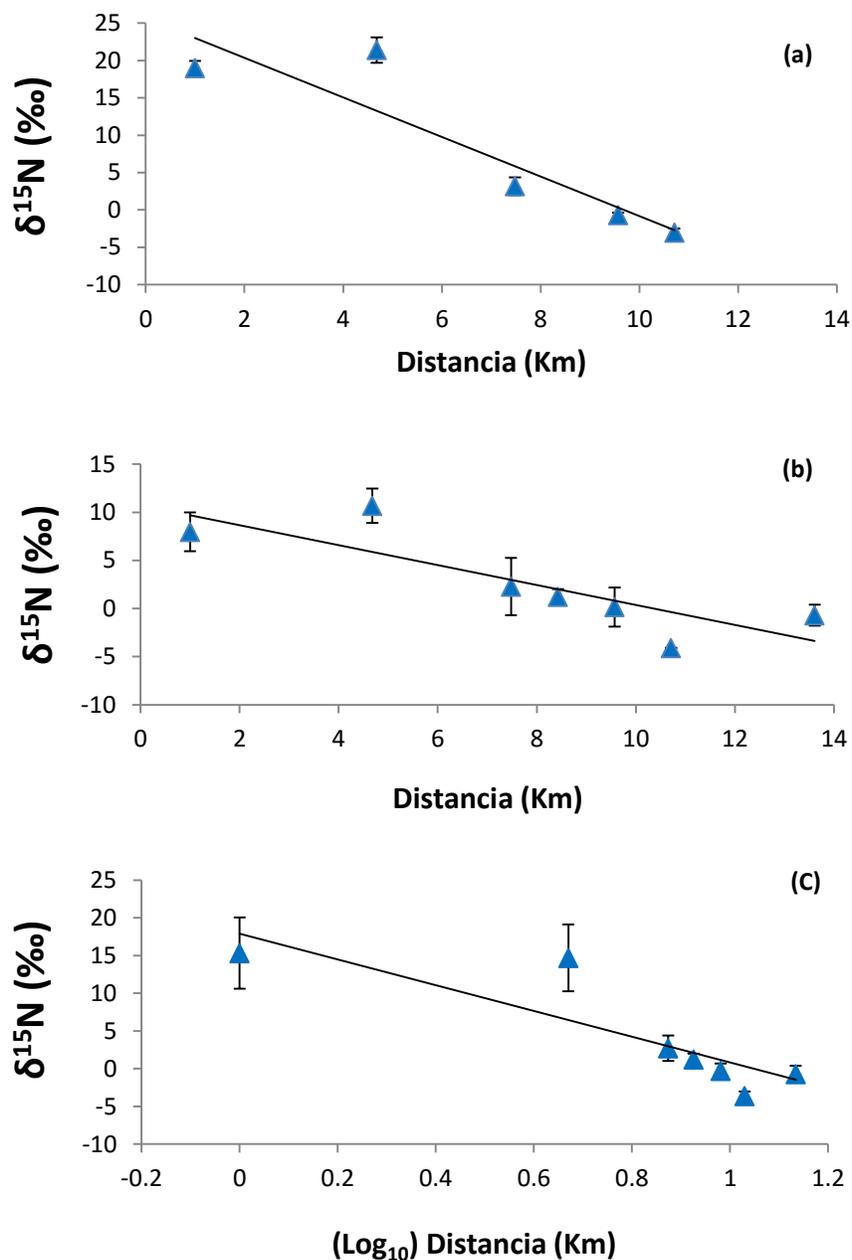
\* Los datos de macrófitas representan la media del  $\delta^{15}\text{N}$  integrado para los meses de abril y septiembre. El resto de los datos representan valores individuales de  $\delta^{15}\text{N}$  para MOP (septiembre), sedimentos (abril) y perifiton (abril y sept.).

#### 4.2.1.1. $\delta^{15}\text{N}$ en macrófitas

La tendencia de empobrecimiento del  $\delta^{15}\text{N}$  en macrófitas resulta significativa tanto en abril ( $p = 0.032$ ,  $R^2 = 0.826$ ; **Fig. 4.2a**) como en septiembre ( $p = 0.02$ ,  $R^2 = 0.691$ ; **Fig. 4.2b**). Cuando los datos de  $\delta^{15}\text{N}$  de ambas épocas se combinan, la relación de empobrecimiento respecto a la distancia también resulta significativa ( $p = 0.014$ ,  $R^2 = 0.732$ ), con valores individuales que van desde +23.31 ‰ (media, +15.31 ‰) en la desembocadura del Katari hasta alcanzar valores negativos de -2.60 ‰ (media, -0.70 ‰) en el punto más alejado fuera de la bahía (**Fig. 4.2c**). Esto implica un empobrecimiento medio de 16 ‰ a lo largo de 14 kilómetros.

En este sentido, se observa que sólo el porcentaje de nitrógeno encontrado en el tejido de macrófitas se eleva con la proximidad a la desembocadura del Katari, alcanzando valores de 3.40 %, mientras que a 10 y 14 kilómetros, los valores descienden a 0.78 % y 1.20 % respectivamente. El patrón observado resulta significativo tanto para los datos de abril ( $p = 0.046$ ,  $R^2 = 0.784$ ; **Anexo C, Fig. 1a**) y septiembre ( $p = 0.021$ ,  $R^2 = 0.685$ ; **Anexo C, Fig. 1b**) como para los valores integrados de ambas épocas (**Anexo C, Fig. 1c**). Este patrón

espacial observado en el porcentaje de nitrógeno puede potencialmente reflejar el hecho de que, en Bahía Cohana, las macrófitas se encuentran naturalmente limitadas en nitrógeno.



**Fig. 4.2.- Composición isotópica de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para macrófitas en Bahía Cohana y su relación con la distancia al Río Katari.** Los datos representan valores individuales de  $\delta^{15}\text{N}$  para los meses de (a) abril ( $p = 0.032$ ,  $R^2 = 0.826$ ), (b) septiembre ( $p = 0.02$ ,  $R^2 = 0.691$ ) y (c) la media integrada de ambas épocas ( $p = 0.014$ ,  $R^2 = 0.732$ ).

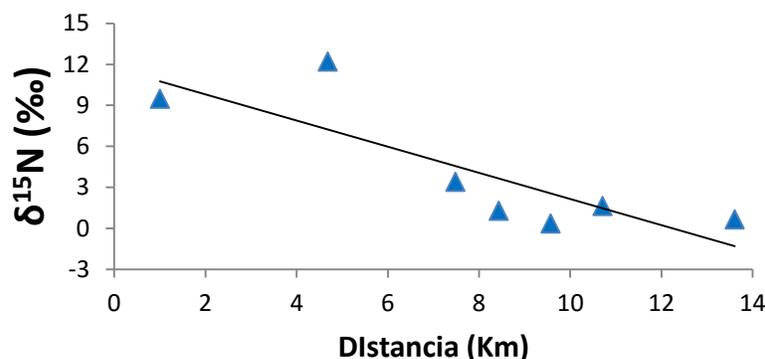
El fraccionamiento isotópico supone un enriquecimiento del sustrato a medida que una reacción se lleva a cabo debido a la conversión preferencial del isótopo liviano (en este caso  $^{14}\text{N}$ ) en el producto (Sulzman 2007). En condiciones donde el nitrógeno está disponible en abundancia, se esperaría que los productores primarios como las macrófitas presenten una señal isotópica empobrecida respecto al nitrógeno inorgánico disuelto (NID) en la columna de agua, debido a que la discriminación en contra del isótopo pesado ( $^{15}\text{N}$ ) es mayor cuando el N se encuentra en exceso (Lake, McKinney et al. 2001). Esto llevaría a un enriquecimiento del NID proporcional a la distancia, por lo que las macrófitas más distantes a la costa debieran mostrar un enriquecimiento similar. Sin embargo, el patrón que se observa es opuesto a lo esperado. Aún más, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  para macrófitas aquí reportados están dentro de los valores considerados por McClelland, Valiela et al. (1997) como típicos del NID que tiene un origen antropogénico. En consecuencia, la distribución espacial del  $\delta^{15}\text{N}$  muestra que la composición isotópica en macrófitas responde mayoritariamente a un cambio en la fuente de N y no a un efecto de fraccionamiento potencial producido por el incremento en la disponibilidad de nitrógeno.

Los resultados de  $\delta^{15}\text{N}$  (**Fig. 4.2**) y porcentaje de nitrógeno (**Anexo C, Fig. 1**) en el tejido de macrófitas reflejan, en primer lugar, la disponibilidad del N antropogénico que llega a la bahía a través del río Katari y en segundo lugar también revelan la capacidad de las macrófitas de asimilar el nitrógeno que no se está originando en el lago (alóctono). Los trabajos de Cole, Valiela et al. (2004) y de Savage y Elmgren (2004) muestran resultados similares de incremento paralelo en la composición isotópica y el porcentaje de nitrógeno en macrófitas cerca de fuentes y emisores de nitrógeno antropogénico.

#### **4.2.1. 2. $\delta^{15}\text{N}$ en la materia orgánica particulada (MOP)**

La tendencia de empobrecimiento del  $\delta^{15}\text{N}$  de la MOP en septiembre resulta significativa ( $p = 0.021$ ,  $R^2 = 0.689$ ), con valores de  $+9.48 \text{ ‰}$  en la desembocadura del Katari hasta alcanzar valores de  $0.64 \text{ ‰}$  a 14 kilómetros de distancia, en el punto más alejado fuera de la bahía (**Fig. 4.3**). Esto implica un empobrecimiento de  $8,84 \text{ ‰}$  a lo largo del transecto que recorre la bahía.

Los elevados valores de  $\delta^{15}\text{N}$  en los sitios de la bahía más próximos a la desembocadura del Katari ( $12.20 \text{ ‰}$  y  $9.50 \text{ ‰}$  a 4.7 y 1 kilómetros de distancia, respectivamente) están dentro del rango de valores reportados por McClelland, Valiela et al. (1997) para el nitrógeno inorgánico disuelto de origen antropogénico ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{NID}} = 10 - 20 \text{ ‰}$ ). Aún más, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  para MOP aquí presentados están en concordancia con los hallados por Miller, Omori et al. (2010), quienes muestran que el incremento del  $\delta^{15}\text{N}$  en la materia orgánica particulada está directamente relacionado con las descargas orgánicas provenientes de poblaciones urbanas.



**Fig. 4.3.- Composición isotópica de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para MOP en Bahía Cohana y su relación con la distancia al Río Katari.** Los datos representan valores individuales de  $\delta^{15}\text{N}$  para materia orgánica particulada (MOP) en septiembre ( $p = 0.021$ ,  $R^2 = 0.689$ ).

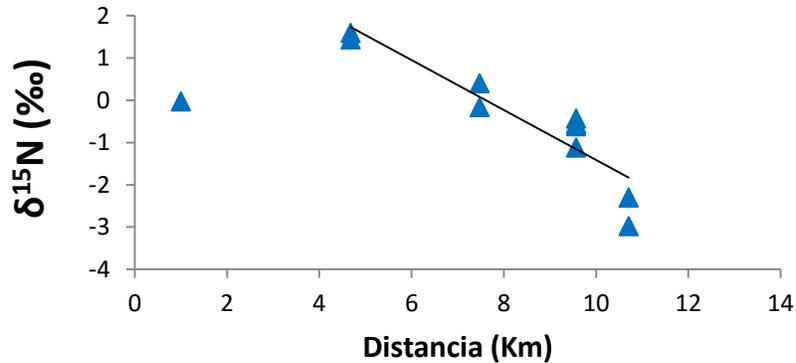
Otros procesos que podrían estar enriqueciendo considerablemente el  $\delta^{15}\text{N}$  del NID y en consecuencia de la MOP son la nitrificación y denitrificación. La primera supone un enriquecimiento del  $\text{NH}_4^+$  a medida que la reacción se lleva a cabo debido a la conversión preferencial del isótopo liviano ( $^{14}\text{N}$ ) en  $\text{NO}_3^-$  y un empobrecimiento proporcional en la señal de este último (Song, Zhao et al. 2014). Sin embargo, la nitrificación es un proceso aeróbico (Canfield, Thamdrup et al. 2005) y las condiciones fisicoquímicas observadas en los sitios de enriquecimiento de la MOP en la bahía (**Tabla 4.1**) sugieren que este proceso no es posible. Por su parte, la denitrificación es un proceso anaerobio (Zehr and Kudela 2011) que implica el enriquecimiento del  $\text{NO}_3^-$  a medida que la reacción se lleva a cabo debido a la conversión preferencial del  $^{14}\text{N}$  en  $\text{N}_2$  y  $\text{N}_2\text{O}$  (Granger, Sigman et al. 2008). En este sentido, se esperaría una reducción en la concentración de  $\text{NO}_3^-$  acoplada a la transformación química (Lehmann, Reichert et al. 2003) respecto al resto de la bahía y no un incremento como el observado en los sitios a 4.7 y 1 kilómetros, respectivamente (**Anexo B, Fig.4**).

En consecuencia, el patrón espacial observado para el  $\delta^{15}\text{N}$  de la MOP está explicado mayoritariamente (69 %) por la distancia y el cambio en la fuente de N, mostrando que el nitrógeno antropogénico que llega a la bahía es el que determina en gran medida la composición isotópica de la materia orgánica particulada próxima a la desembocadura del río, mientras que sitios más alejados presentan MOP constituida por nitrógeno proveniente de un origen distinto.

#### 4.2.1.3. $\delta^{15}\text{N}$ en el sedimento

La tendencia de empobrecimiento del  $\delta^{15}\text{N}$  de los sedimentos resulta significativa ( $p = 0.001$ ,  $R^2 = 0.841$ ), con un valor medio de +1.52 ‰ en el sitio más próximo a la

desembocadura del Katari y llegando a alcanzar un valor medio de  $-2.63\text{‰}$  en el punto más alejado fuera de la bahía (P1), a 12 kilómetros de distancia (**Fig. 4.4**). Esto muestra una variación espacial en la señal isotópica del  $\delta^{15}\text{N}$  de  $4.15\text{‰}$  a lo largo de toda la bahía.



**Fig. 4.4.- Composición isotópica de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para sedimentos en Bahía Cohana y su relación con la distancia al Río Katari.** Los datos representan valores individuales de  $\delta^{15}\text{N}$  para sedimentos en septiembre ( $p = 0.021$ ,  $R^2 = 0.689$ ).

Los sedimentos son grandes integradores del metabolismo de los ecosistemas acuáticos ya que registran las transformaciones y variaciones en el flujo de la materia y energía a lo largo del tiempo (Jones, King et al. 2004). En este sentido, la composición isotópica de la materia orgánica de los sedimentos refleja la evolución espacial y temporal durante las fluctuaciones en el estado trófico de los lagos. Esto se debe a que en gran medida son los productores primarios, como algas y macrófitas, los que determinan la señal isotópica de los sedimentos al ser los más susceptibles a dichas alteraciones (Wu, Lin et al. 2006), por lo que los cambios en la productividad primaria o estado trófico de los lagos son la causa más comúnmente asociada a las fluctuaciones del  $\delta^{15}\text{N}$  de los sedimentos (Wu, Huang et al. 2007).

En este sentido, la distancia a la fuente de emisiones contaminantes (Río Katari) es la que explica mayoritariamente el patrón de cambio observado para la señal del  $\delta^{15}\text{N}$  de los sedimentos (84 %). Esto muestra que, al igual que para el caso de los productores primarios (macrófitas y MOP), la distribución espacial del  $\delta^{15}\text{N}$  está determinada fuertemente por un cambio paulatino en la fuente del nitrógeno, más alguna interferencia mínima debida a procesos comunes en el sedimento como la diagénesis temprana (Freudenthal, Wagner et al. 2001; Gälman, Rydberg et al. 2009) o la asimilación biológica (Wu, Huang et al. 2007), los cuales se ha observado pueden generar variaciones en el  $\delta^{15}\text{N}$ . Los resultados aquí obtenidos concuerdan con los observados por Vreca y Muri (2006), quienes también observan que el cambio en la fuente del nitrógeno que llega a los sedimentos es la que explica significativamente la correlación observada en el cambio de la señal del  $\delta^{15}\text{N}$ .

Comparativamente, la variación observada para el  $\delta^{15}\text{N}$  de los sedimentos a lo largo de la bahía es considerablemente menor (4.15 ‰) a la observada para la materia orgánica particulada y macrófitas (8.84 ‰ y 16 ‰ respectivamente). Los trabajos de Vreca y Muri (2006), Drew et al. (2008) y Liu et al. (2010) muestran una variación similar (menor a 5 ‰) en ecosistemas lóticos que atraviesan situaciones de cambio en el estado trófico hacia procesos marcados de eutrofización. Sin embargo, esto también puede deberse al hecho de que en función de la tasa de sedimentación, cada centímetro del sedimento puede equivaler a periodos de tiempo muy variables [ej. Wang et al. (2009), Kenney et al. (2010)].

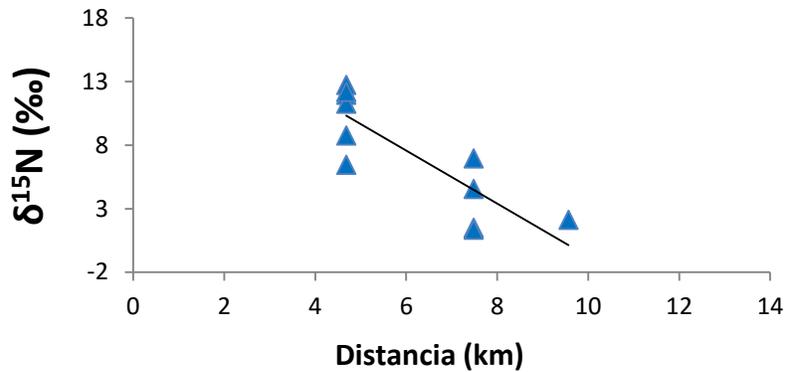
Considerando que se desconoce la velocidad de sedimentación para la zona de Bahía Cohana de las últimas tres décadas, los 10 centímetros superficiales colectados durante este trabajo representan un intervalo de tiempo desconocido, por lo que la señal del  $\delta^{15}\text{N}$  puede encontrarse atenuada si se considera que la eutrofización de la bahía es un proceso que se ha ido intensificando sólo en las últimas dos décadas (Ribera 2008).

#### **4.2.1.4. $\delta^{15}\text{N}$ en el perifiton**

Los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  del perifiton no mostraron una relación significativa para cada época del año (datos no mostrados). Sin embargo, el  $\delta^{15}\text{N}$  integrado para las dos épocas si muestra una tendencia de empobrecimiento relativa a la distancia que resulta significativa ( $p = 0,001$ ,  $R^2 = 0,7$ ), con un valor medio de +10.58 ‰ a 4.7 kilómetros de distancia de la desembocadura del Katari y de 2.14 ‰ en el punto más alejado, a 10 kilómetros de distancia (**Fig. 4.5**). Esto muestra una variación espacial en la señal isotópica del  $\delta^{15}\text{N}$  a lo largo de toda la bahía de 8.44 ‰.

El trabajo de Scott et al. (2007) muestra que la fijación biológica de N del perifiton se ve reducida a medida que la concentración de nitrógeno reactivo (Nr) en la matriz interna del perifiton se incrementa. Esto a su vez depende y está en relación con la concentración de Nr en el ambiente, fuera de la matriz. Por consiguiente, el perifiton resulta muy sensible ante las variaciones de nutrientes en el ambiente y puede potencialmente reflejar de manera fiel estos cambios.

Los elevados valores registrados a casi 5 kilómetros de distancia de la desembocadura del río apuntan a que la fuente principal de nitrógeno para el perifiton es el Nr de origen antropogénico que llega a la Bahía a través del Katari. Estos valores están en concordancia con el trabajo de Bergfur et al. (2009), quienes también muestran enriquecimiento en la señal del  $\delta^{15}\text{N}$  asociado al incremento de nutrientes de fuentes antropogénicas. En contra parte, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  cercanos a 0 observados a 10 kilómetros de la costa muestran un origen del nitrógeno completamente diferente. Estos datos están en el rango de valores de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados para el N que es obtenido de la atmósfera a través de la fijación biológica del nitrógeno (FBN) por el perifiton (Liao and Inglett 2012).



**Fig. 4.5.- Composición isotópica de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para perifiton en Bahía Cohana y su relación con la distancia al Río Katari.** Los datos representan valores individuales de  $\delta^{15}\text{N}$  para perifiton durante abril y septiembre ( $p = 0.021$ ,  $R^2 = 0.689$ ).

Al igual que para los otros casos, el patrón espacial observado para el  $\delta^{15}\text{N}$  del perifiton está explicado en su mayoría por la distancia y el cambio en la fuente de N, mostrando que el Nr antropogénico es la fuente principal en los sitios próximos a la desembocadura del Katari, mientras que la FBN resulta potencialmente como la fuente principal en el extremo opuesto y no perturbado de la bahía.

Como se puede observar, el marcador isotópico de nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) de los productores primarios y del sedimento muestra un patrón espacial similar en todos los casos. Esto refleja, en primer lugar, que el nitrógeno reactivo (Nr) que se origina a partir de actividades humanas está efectivamente llegando a Bahía Cohana, a través del río Katari. En segundo lugar, el Nr de origen antropogénico que llega a la bahía está siendo asimilado y aprovechado por los productores primarios. Aún más, el enriquecimiento del  $\delta^{15}\text{N}$  observado en los productores primarios sugiere que el nitrógeno antropogénico disponible proviene específica y predominantemente de desechos y desagües humanos, en contraposición a otras actividades humanas que puedan estar potencialmente presentes, como la agricultura y el uso de fertilizantes, las cuales, sin embargo, poseen una firma isotópica particular, diferente a la observada para los sitios afectados en Bahía Cohana.

#### 4.2.2. Carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ )

La composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) para macrófitas, MOP, sedimentos y perifiton se muestra de forma resumida en la **tabla 4.3**. Con excepción del perifiton, el  $\delta^{13}\text{C}$  de los otros compartimientos mostró una tendencia de enriquecimiento con relación a la distancia a la desembocadura del Katari, pero con particularidades para cada caso.

**Tabla 4.3.-** Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) en los cuatro compartimientos para Bahía Cohana.

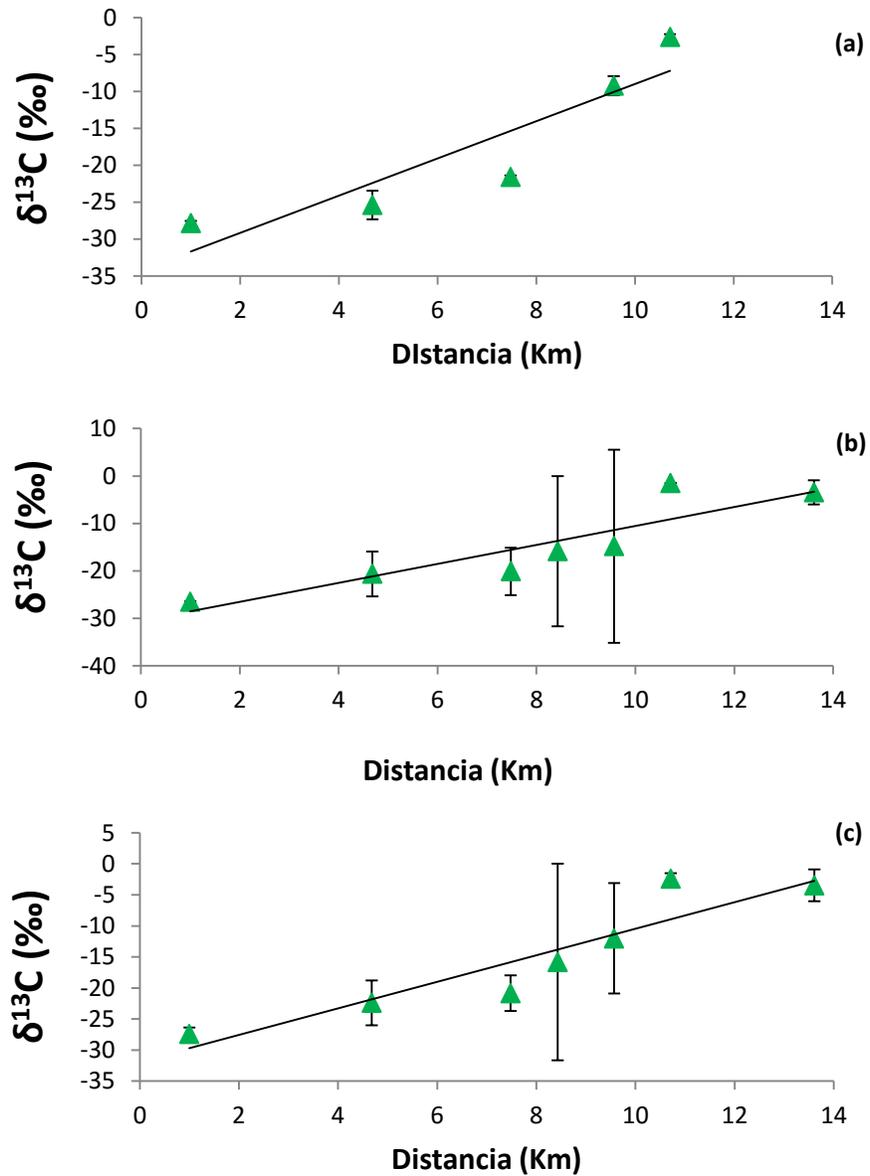
	Sitios de muestreo (‰)							Sitios Control (‰)	
	L3 (13.6 Km)	P1 (10.7 Km)	P2 (9.6 Km)	P2,5 (8.4 Km)	P3 (7.5 Km)	P4 (4.7 Km)	P5 (1 Km)	C1	C2
<b>Macrófitas*</b>	-3.46	-2.38	-12.01	-15.83	-20.85	-22.40	-27.40	-22.78	-4.74
<b>MOP</b>	-17.76	-17.56	-17.32	-18.10	-21.50	-24.78	-28.82		-18.18
<b>Sedimento</b>		-1.93	-7.72	0.12	-17.23	-24.55	-26.02		-20.31
<b>Perifiton</b>			-18.15		-23.36	-19.33		-28.66	-15.22

\* Los datos de macrófitas representan la media del  $\delta^{13}\text{C}$  integrado para los meses de abril y septiembre. El resto de los datos representan valores individuales de  $\delta^{13}\text{C}$  para MOP (septiembre), sedimentos (abril) y perifiton (abril y sept.).

##### 4.2.2.1. $\delta^{13}\text{C}$ en macrófitas

La tendencia de enriquecimiento del  $\delta^{13}\text{C}$  de las macrófitas resulta significativa con relación a la distancia, tanto en abril ( $p = 0.034$ ,  $R^2 = 0.822$ ; **Fig. 4.6a**) como en septiembre ( $p = 0.006$ ,  $R^2 = 0.804$ ; **Fig. 4.6b**). De manera similar al nitrógeno, los datos integrados de  $\delta^{13}\text{C}$  de ambas épocas muestran también una relación de enriquecimiento significativa respecto a la distancia ( $p = 0.003$ ,  $R^2 = 0.855$ ), con valores individuales que van desde -30 ‰ (media, -27.40 ‰) en la desembocadura del Katari hasta llegar a valores cercanos a 0 (media, -3.5 ‰) en el punto más alejado fuera de la bahía (**Fig. 4.6c**). Esto implica que en los 14 Km de recorrido de toda la bahía existe un enriquecimiento progresivo del  $\delta^{13}\text{C}$  en macrófitas de 23.90 ‰.

Se ha observado una relación estrecha entre las actividades humanas y el incremento del carbono orgánico disuelto (COD) que llega a los cuerpos de agua (Stanley, Powers et al. 2012), por lo que se suele asumir que los lagos son receptores de mucho de este COD alóctono. Sin embargo, en ecosistemas que reciben gran aporte de nutrientes y/o son muy productivos, se esperaría una contribución significativamente mayor de COD autóctono debido a la intensificación de la productividad primaria (Bade, Carpenter et al. 2007).



**Fig. 4.6.- Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) para macrofitas en Bahía Cohana y su relación con la distancia al Río Katari.** Los datos representan valores individuales de  $\delta^{13}\text{C}$  para los meses de (a) abril ( $p = 0.034$ ,  $R^2 = 0.822$ ), (b) septiembre ( $p = 0.006$ ,  $R^2 = 0.804$ ) y (c) la media integrada de ambas épocas ( $p = 0.003$ ,  $R^2 = 0.855$ ).

En este sentido, el CO<sub>2</sub> producido por los heterótrofos durante la respiración del COD generaría un empobrecimiento del δ<sup>13</sup>C (France 1996) pero siempre con valores cercanos al substrato orgánico donde se originaron (Fry and Sherr 1984). Por su parte, la materia orgánica que proviene de la tierra refleja en gran medida la composición isotópica de las plantas que crecen sobre ella, con valores de δ<sup>13</sup>C similares o ligeramente más empobrecidos a los observados para plantas C3 y C4 (Boutton 1996). Por su parte, se ha observado que la producción primaria acuática genera valores de δ<sup>13</sup>C considerablemente más enriquecidos a los observados para la fotosíntesis terrestre (Fry 2006).

Consecuentemente, en los sitios cercanos a la desembocadura del Katari, el COD alóctono muestra un papel predominante como la fuente principal de carbono para autótrofos y heterótrofos, a pesar de la intensa eutrofización observada (**Fig. 4.6**). Aún más, los resultados de la concentración de COD (**Anexo B, Fig. 1 y 2**) y los valores de δ<sup>13</sup>C (**Fig. 4.6**) obtenidos para Bahía Cohana están en concordancia con los trabajos realizados por France (2000) y Lambert et al. (2011), en los que se observa que el incremento del COD alóctono viene acompañado de una disminución del δ<sup>13</sup>C en la biota de ecosistemas acuáticos.

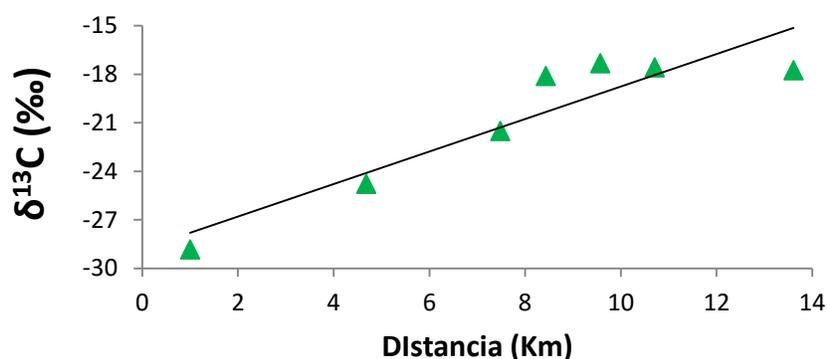
A medida que la distancia a la costa aumenta, el δ<sup>13</sup>C se enriquece, con valores que se aproximan a 0 en los dos sitios fuera de Bahía Cohana (a 10.7 y 13.6 kilómetros). Estos sitios están ocupados únicamente por la familia Characeae, algas verdes multicelulares que se asemejan a plantas vasculares. Sin embargo, valores de δ<sup>13</sup>C tan positivos son inusuales, considerando que los valores de δ<sup>13</sup>C observados durante el fraccionamiento fotosintético para algas se encuentran alrededor de -20 ‰ o ligeramente más positivos (Cole, Carpenter et al. 2002; Bade, Carpenter et al. 2007; de Kluijver, Schoon et al. 2014). Una potencial explicación a este fenómeno se encuentra en el hecho de que las algas verdes y diatomeas poseen la capacidad de asimilar carbonatos cuando las concentraciones de CO<sub>2</sub> disminuyen o son insuficientes (Zohary, Erez et al. 1994; Bontes, Pel et al. 2006). Considerando que los carbonatos están 8 ‰ más enriquecidos en comparación al CO<sub>2</sub> disuelto (Zohary, Erez et al. 1994; Bontes, Pel et al. 2006), se puede esperar un enriquecimiento proporcional en la señal isotópica de los productores primarios que viran hacia la asimilación de esta forma alternativa de carbono.

Se observa además un amplio rango de valores para los sitios a 9.6 y 8.4 kilómetros de distancia. Esto se debe al hecho de que la macrófita emergente *S. californicus* (totora) muestra gran amplitud en la composición isotópica de sus tejidos, con valores de δ<sup>13</sup>C muy empobrecidos (asociados generalmente a plantas C3), los cuales no muestran relación con la distancia a la que se encuentren respecto a la desembocadura del Katari. Estos valores de δ<sup>13</sup>C resultan muy distintos a los observados en las macrófitas sumergidas para los mismos sitios. Esto sugiere que *S. californicus* obtiene el carbono predominantemente de la

atmosfera en forma de CO<sub>2</sub>, y no así de cualquier otra forma inorgánica disuelta (CID) que pueda estar presente en el agua.

#### 4.2.2.2. $\delta^{13}\text{C}$ en la materia orgánica particulada (MOP)

El  $\delta^{13}\text{C}$  de la MOP presenta una tendencia de enriquecimiento significativa con relación a la distancia ( $p = 0.003$ ,  $R^2 = 0.856$ ), con valores de  $-24.78$  ‰ en la desembocadura del Katari hasta alcanzar valores menos negativos de  $-17.76$  ‰ a 14 kilómetros de distancia, en el punto más alejado fuera de la bahía (Fig. 4.7). Esto implica un enriquecimiento de  $7.02$  ‰ a lo largo del transecto que recorre toda la bahía.



**Fig. 4.7.- Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) para MOP en Bahía Cohana y su relación con la distancia al Río Katari.** Los datos representan valores individuales de  $\delta^{13}\text{C}$  de la materia orgánica particulada (MOP) para septiembre ( $p = 0.003$ ,  $R^2 = 0.856$ ).

Las algas utilizan al menos cuatro formas conocidas de RubisCO (Ishida and Green 2002), las cuales varían ampliamente en cuanto a su estructura, afinidad por el CO<sub>2</sub> y velocidad de reacción (Tabita, Hanson et al. 2007). En consecuencia, se ha observado que la discriminación en contra del <sup>13</sup>C para cada forma de RubisCO es muy variable (Robinson, Scott et al. 2003; Scott, Schwedock et al. 2004; Boller, Thomas et al. 2011; Boller, Thomas et al. 2015) y genera valores de  $\delta^{13}\text{C}$  que difieren considerablemente entre los distintos grupos taxonómicos que conforman el fitoplancton (Vuorio, Meili et al. 2006). En situaciones de eutrofización donde la comunidad de algas se ve modificada por el incremento de nutrientes (Salmaso 2010), se puede esperar que el cambio de la comunidad de algas genere también un cambio en la señal del  $\delta^{13}\text{C}$  en un gradiente de nutrientes. Sin embargo, la ausencia de datos sobre composición algal para Bahía Cohana no permite especular más al respecto. A pesar de este hecho, la hipótesis del cambio en la fuente de carbono (al igual que para el caso de macrófitas y sedimentos) resulta mucho más probable debido a que ambos compartimientos pertenecen al mismo ecosistema y están bajo los mismos efectos.

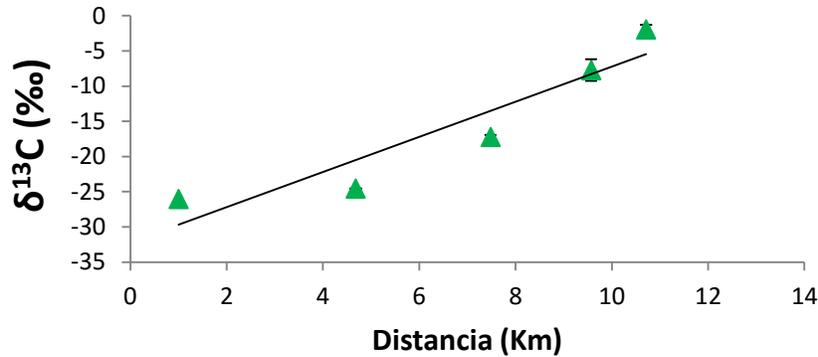
En este sentido, se ha observado que valores muy negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  (entre -24 y -27 ‰) están asociados a valores en la proporción C:N de entre 10 y 20, los cuales son típicos del material orgánico de origen terrestre. Por el contrario, valores comparativamente más enriquecidos de  $\delta^{13}\text{C}$  (entre -17 y -22 ‰) están asociados a valores de C:N algo inferiores (entre 6 y 15), los cuales se esperan de la materia orgánica autóctona acuática (Tan, Cai et al. 1991; Wu, Zhang et al. 2003). Consecuentemente, los elevados valores de  $\delta^{13}\text{C}$  encontrados en Bahía Cohana para los sitios más próximos a la desembocadura del Katari (-24.8 ‰ y -28.8 ‰ a 4.7 y 1 kilómetros, respectivamente) están en concordancia con los valores reportados por (Miller, Omori et al. 2010), quienes obtienen resultados similares para la señal del carbono que proviene o está asociado a actividades y efectos antropogénicos, mientras que los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  más positivos observados en el extremo opuesto de la bahía están dentro de lo esperado para fuentes de carbono autóctonas.

En efecto, el patrón espacial observado para el  $\delta^{13}\text{C}$  está explicado mayoritariamente por la distancia y el cambio en la fuente de carbono, mostrando que el C antropogénico que llega a la bahía es el que está determinando en gran medida la composición isotópica de la materia orgánica particulada próxima a la desembocadura del río, mientras que sitios más alejados presentan MOP que está asimilando carbono proveniente de un origen distinto.

#### 4.2.2.3. $\delta^{13}\text{C}$ en el sedimento

El  $\delta^{13}\text{C}$  de los sedimentos también muestra una tendencia de enriquecimiento significativa con relación a la distancia ( $p = 0.020$ ,  $R^2 = 0.872$ ), con un valor medio de -26 ‰ en el sitio más próximo a la desembocadura del Katari (a 1 kilómetro) y llegando a alcanzar un valor medio más positivo de -1.9 ‰ en el punto más alejado fuera de la bahía, a 12 kilómetros de distancia (**Fig. 4.8**). Esto quiere decir que existe una variación espacial en la señal isotópica de los sedimentos de 24 ‰ a lo largo de toda la bahía.

El fraccionamiento isotópico durante la fotosíntesis acuática supone un enriquecimiento del CID debido a la utilización preferencial del  $^{12}\text{C}$  por los productores primarios, los cuales en contraparte se empobrecen. A medida que todo el  $^{12}\text{C}$  es absorbido y utilizado, el CID enriquecido restante es incorporado por los productores primarios, los cuales al morir, precipitan y arrastran la señal enriquecida del  $\delta^{13}\text{C}$  a los sedimentos (Hodell and Schelske 1998). En este sentido y de manera similar al  $\delta^{15}\text{N}$ , el cambio del  $\delta^{13}\text{C}$  en los sedimentos a lo largo de un gradiente de eutrofización está mayoritariamente determinado por alteraciones en el estado trófico y en la productividad primaria (Wu, Lin et al. 2006), más alguna contribución mínima generada *in situ* durante la degradación bacteriana o la diagénesis (France 1996; Hodell and Schelske 1998).

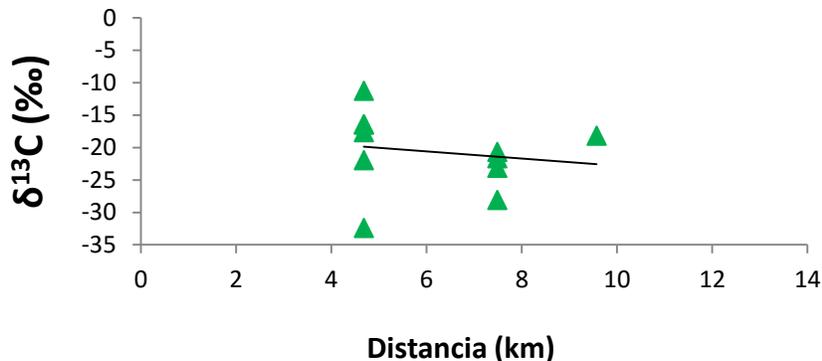


**Fig. 4.8.- Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) para el sedimento en Bahía Cohana y su relación con la distancia al Río Katari.** Los datos representan valores individuales de  $\delta^{13}\text{C}$  para abril ( $p = 0,020$ ,  $R^2 = 0,872$ ).

Se observa, por tanto, que la eutrofización genera un enriquecimiento en la señal de los sedimentos, como lo muestran los trabajos de Wang et al. (2009) y Liu et al. (2010). Sin embargo, el patrón observado en Bahía Cohana es opuesto al observado en estos trabajos. Esto sugiere que el cambio en la fuente de carbono es la que determina el patrón espacial observado para  $\delta^{13}\text{C}$  y no así las modificaciones en la productividad primaria producidas por el proceso de eutrofización. Junto con los resultados obtenidos para COD (**Fig. 4.1**), se puede observar que el COD alóctono está jugando un papel predominante en los sitios más próximos a la desembocadura del Katari como fuente principal de carbono para autótrofos y heterótrofos, a pesar de que existe un marcado proceso de eutrofización. En efecto, los resultados acá obtenidos están de acuerdo con el trabajo de Vreca y Muri (2006), quienes asocian valores muy negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  a fuentes terrestres de materia orgánica.

#### 4.2.2.4. $\delta^{13}\text{C}$ en el perifiton

Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  del perifiton son los únicos que no muestran relación con la distancia a la desembocadura del Katari ( $R^2 = 0.028$ ), con valores que oscilan entre -11.24 ‰ y -32.40 ‰ a lo largo de toda la bahía (**Fig. 4.9**). Se observa también un gran rango de valores en la señal para cada sitio de muestreo, con una variación de 8 ‰ y 21 ‰ a 7.5 y 4.7 kilómetros, respectivamente. Al igual que para el caso del  $\delta^{15}\text{N}$ , el  $\delta^{13}\text{C}$  del perifiton tampoco mostró relaciones significativas para cada época del año por separado (datos no mostrados).



**Fig. 4.9.- Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) para perifiton en Bahía Cohana y su relación con la distancia al Río Katari.** Los datos representan valores individuales de  $\delta^{13}\text{C}$  para abril y septiembre ( $p = 0.001$ ,  $R^2 = 0.7$ ).

Como se observa, la variación espacial para el  $\delta^{13}\text{C}$  del perifiton en Bahía Cohana no muestra estar asociada a un cambio en la fuente del carbono ni tampoco está relacionada con un proceso de dilución de los nutrientes, considerando que el trabajo realizado por de Kluijver, Ning et al.(2015) muestra que en lagos poco profundos y eutrofizados, las macrófitas y su perifiton asociado poseen  $\delta^{13}\text{C}$  similares. Esta aparente contradicción respecto a las relaciones observadas para el carbono en macrófitas y materia orgánica particulada puede estar explicada por efectos y alteraciones propias de la matriz compleja que representa el perifiton.

A diferencia de la composición isotópica de N, se ha observado que el  $\delta^{13}\text{C}$  del perifiton muestra una fluctuación que está en estrecha relación a la biomasa propia del perifiton (Hill and Middleton 2006). Los agregados de perifiton van desde biofilms muy delgados, de 2 o 3 células de ancho, a comunidades muy “gruesas” de cientos de células de espesor. En condiciones donde el perifiton es grueso, no todas las células dentro de la comunidad del perifiton tienen la misma disponibilidad y acceso a la fuente de carbono, por lo que al encontrarse limitadas en este elemento, tienen a discriminar menos en contra del  $^{13}\text{C}$ , mostrando en consecuencia una señal de  $\delta^{13}\text{C}$  enriquecida (Hill and Middleton 2006). En este sentido, el trabajo de Staal et al. (2007) muestra que a mayor crecimiento del perifiton (reflejada en forma de biomasa), mayor es la variación en la señal del  $\delta^{13}\text{C}$ .

Por su parte, en condiciones donde el  $\text{CO}_2$  es limitado, el perifiton puede asimilar también  $\text{HCO}_3^-$  el cual, como ya se ha visto, posee una señal isotópica enriquecida respecto al  $\text{CO}_2$  (ver  $\delta^{13}\text{C}$  en macrófitas), generando valores más positivos en la señal isotópica del perifiton (Fry 1996). Además, muchas algas que conforman el perifiton pueden, en condiciones de limitación de carbono, acelerar la conversión de  $\text{HCO}_3^-$  en  $\text{CO}_2$  mediante la enzima anhidrasa carbónica y aumentar así la cantidad de  $\text{CO}_2$  disponible en la matriz interna del

perifiton (Cassar, Laws et al. 2004). Este proceso altera el  $\delta^{13}\text{C}$  del  $\text{CO}_2$  y se ha observado que genera un enriquecimiento en la señal del perifiton de hasta 10 ‰ (Goericke, Montoya et al. 1994).

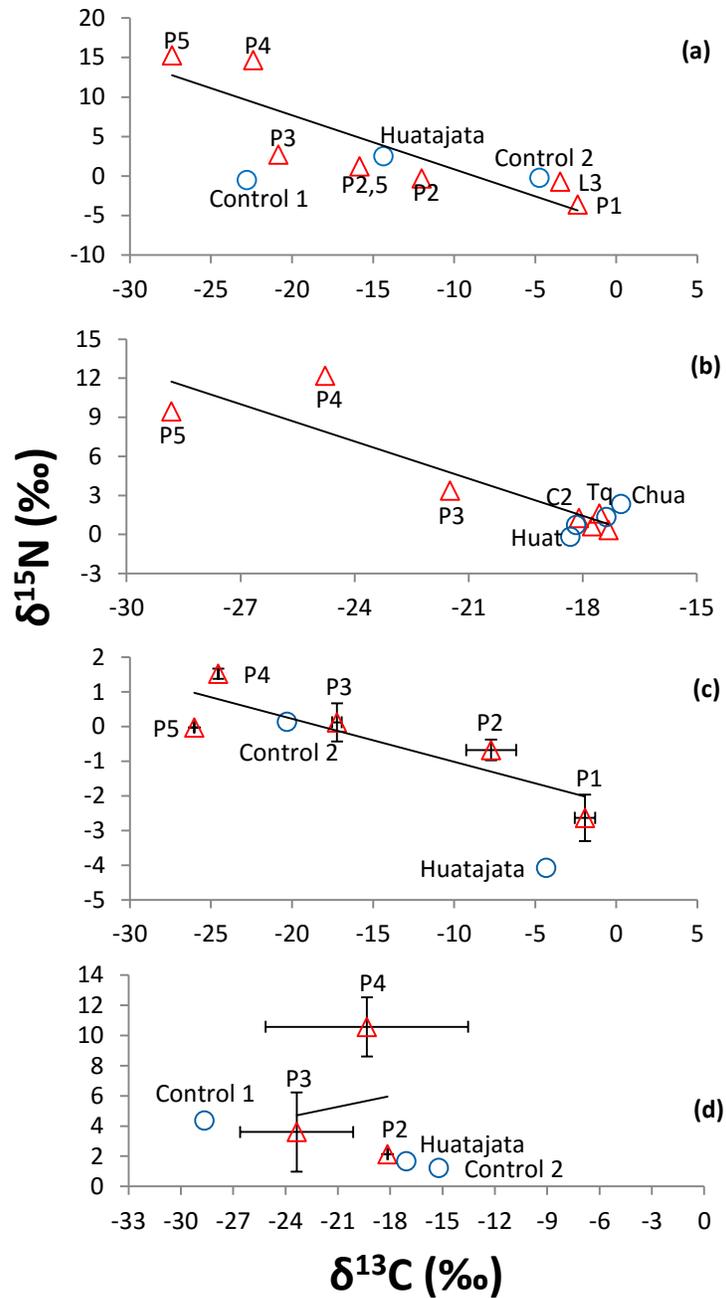
En este sentido y aunque el  $\delta^{13}\text{C}$  del perifiton no mostró tendencia ni relación alguna, los datos obtenidos se encuentran dentro del rango de valores reportados por Hill et al. (2008), quienes afirman que los procesos antes mencionados así como la intensidad de luz y cantidad de nutrientes son los principales modeladores de la composición isotópica de carbono del perifiton.

Como se puede observar, el marcador isotópico de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) muestra un patrón espacial similar en macrófitas, materia orgánica particulada y sedimento. Sin embargo, el mismo marcador no muestra tendencia alguna en el caso del perifiton. A excepción de este último, el  $\delta^{13}\text{C}$  de los productores primarios y del sedimento funciona como una herramienta útil para determinar los aportes de carbono y permite dilucidar el origen del carbono orgánico presente en Bahía Cohana, el cuales predominantemente alóctono, a pesar del aporte potencial generado por la sobre estimulación de la productividad primaria debido al proceso eutrófico.

Es importante mencionar, sin embargo, que el  $\delta^{13}\text{C}$  de macrófitas debe ser analizado y utilizado con cautela, debido a que las macrófitas emergentes muestran una señal isotópica que no presenta relación con la distancia y que difiere considerablemente de las que se encuentran sumergidas para los mismos sitios. En este sentido, las macrófitas emergentes interfieren al momento de determinar el origen del carbono que llega a la bahía. Por su parte, el  $\delta^{13}\text{C}$  del perifiton, mostró no ser útil como marcador para el caso de la Bahía de Cohana, debido a la interferencia generada por los procesos propios e inherentes a la matriz compleja que constituye el perifiton.

#### **4.2.3. Relaciones $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$**

La relación entre los registros isotópicos obtenidos para nitrógeno y carbono se muestran en la **figura 5.1**. Tanto las macrófitas, la MOP y los sedimentos muestran una fuerte correlación significativa entre los datos de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$ , con valores de  $R^2$  de 0.73, 0.8 y 0.74 respectivamente (**Fig. 5.1**). El perifiton no muestra una relación entre los dos elementos debido a que sólo el nitrógeno está relacionado significativamente con la distancia, al ser el único elemento que muestra una distribución espacial explicada por un cambio en las fuentes de dicho elemento.



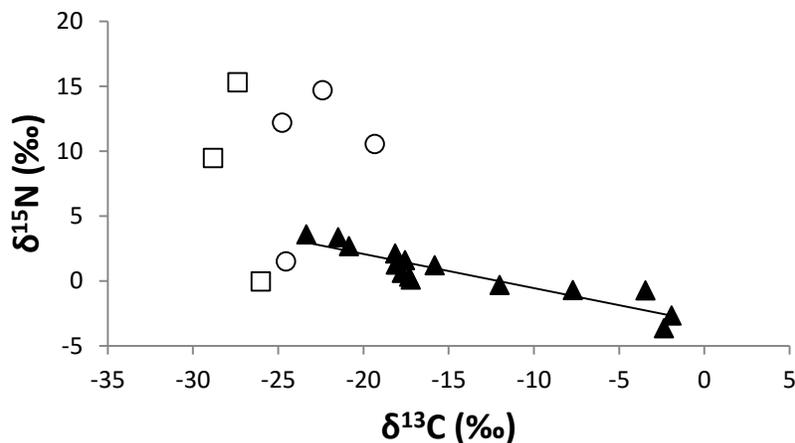
**Fig. 5.1.- Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) en Bahía Cohana y el Lago Menor.** Los datos representan la proporción isotópica de C y N para el transecto en Bahía Cohana (triángulos rojos) y para otros sitios dentro del Lago Menor (círculos azules). Los datos de macrófitas (a) representan la media de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  integrados para los meses de abril y septiembre ( $p = 0.014$ ,  $R^2 = 0.729$ ). El resto de los datos representan valores individuales de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  para (b) MOP en sept. ( $p = 0.006$ ,  $R^2 = 0.803$ ), (c) sedimentos en abril ( $p = 0.006$ ,  $R^2 = 0.743$ ) y (d) perifiton integrado de abril y sept. ( $R^2 = 0.020$ ).

Los registros isotópicos para otros sitios dentro del lago menor como Huatajata y Tiquina muestran valores intermedios, entre los observados para sitios próximos a la desembocadura del Katari y los registrados a 12 o 14 kilómetros de distancia. Esto sugiere que ambos sitios están siendo afectados por actividades antropogénicas, aunque no estén presentes las señales ni los efectos típicamente asociados a los procesos de eutrofización, debido principalmente a que la intensidad de dicho proceso es todavía mucho menor en comparación a lo observado en Bahía Cohana (**Fig. 5.1a y 5.1b**).

Los sitios de control muestran una situación similar, corroborada ya por los datos de COD (**Anexo B, Fig. 1 y 2**), aunque con una diferencia entre el sitio C1 y C2 (**Fig. 5.1a**). Ésta puede ser explicada por un efecto de dilución en relación con la distancia, similar al observado en Bahía Cohana. Pero, además, los dos sitios control están separados por una estrecha hilera de *S. californicus* (totora), la cual podría estar reteniendo en cierta medida el flujo de carga de nutrientes entre los dos sitios de control.

Como se puede observar, la relación negativa entre los dos parámetros isotópicos utilizados apunta a que ambos elementos y sus respectivos ciclos están relacionados (excepto para el perifiton), debido principalmente al hecho de que tanto el carbono como el nitrógeno comparten orígenes similares, los cuales están determinados y van cambiando en función a la distancia al río Katari. En el extremo más próximo a la bahía, la firma isotópica característica está representada por valores muy enriquecidos para el  $\delta^{15}\text{N}$  y muy empobrecidos para el  $\delta^{13}\text{C}$ . En sentido contrario, en el extremo opuesto de la bahía, la firma isotópica para los mismos compartimientos del ecosistema -de la parte menos intervenida del lago en términos de eutrofización- está caracterizada por valores algo más relativos, pero que comparativamente, tienden por lo general hacia el empobrecimiento de la señal del  $\delta^{15}\text{N}$  y al enriquecimiento de la señal del  $\delta^{13}\text{C}$ . Estos resultados, a su vez, no permiten generalizar respecto a una señal isotópica específica y particular que pueda caracterizar al lago menor en todos sus compartimientos. Sin embargo, es posible establecer una firma isotópica de referencia que es claramente diferenciable de la señal que proviene de actividades humanas y efectos antropogénicos.

Aún más, los datos integrados de la relación entre  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  para macrófitas, MOP, sedimento y perifiton permiten observar que el proceso de eutrofización en Bahía Cohana consta de dos etapas espacialmente bien diferenciadas (**Fig. 5.2**). La primera y más próxima a la desembocadura del Katari muestra un proceso de eutrofización intenso, sin efectos de dilución ni otros procesos claramente relacionados con la distancia a la fuente contaminante. Una segunda etapa, caracterizada por un proceso de eutrofización menor y un efecto de dilución de los nutrientes que recorre toda la bahía, reflejada por la fuerte relación ( $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.843$ ) entre el cambio en la señal de ambos parámetros isotópicos y la distancia.



**Fig. 5.2.- Composición isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ) para el transecto en Bahía Cohana.** Los datos representan la proporción isotópica de C y N integrada para todos los compartimientos del ecosistema evaluados (macrófitas, MOP, sedimentos y perifiton). Los triángulos negros representan muestras de los sitios desde P3 hasta L3 ( $p < 0,001$ ,  $R^2 = 0,843$ ), es decir, desde los 7,5 a los 13,6 Km de distancia respectivamente de la desembocadura del Katari. Los símbolos vacíos representan muestras de los sitios P5 (cuadrados) y P4 (círculos) a 1 y 4,7 Km de distancia, respectivamente.

Estos datos muestran finalmente que el intenso proceso de eutrofización que agobia la Bahía de Cohana está fuertemente influenciado por la distancia a la fuente contaminante, como lo es en la actualidad el río Katari. Pero que, además, el proceso de eutrofización no ha superado la barrera de totoras de las bahías de Pariti y Cumana, quedando actual y exclusivamente confinado al interior de la bahía.

## 5. CONCLUSIONES

Los dos parámetros isotópicos utilizados en este trabajo ( $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$ ) mostraron ser útiles como marcadores de enriquecimiento orgánico en la Bahía de Cohana. A través de parámetros clásicos como el carbono orgánico disuelto y datos fisicoquímicos del agua se pudo corroborar la eficacia de ambos marcadores como indicadores de procesos de eutrofización incipiente.

El marcador isotópico de nitrógeno mostró un enriquecimiento en el sedimento y en los productores primarios que permite identificar la presencia y disponibilidad del aporte de nitrógeno antropogénico que llega a Bahía Cohana.

Por su parte, el marcador isotópico de carbono permitió establecer el origen terrestre del carbono orgánico en Bahía Cohana, además de determinar su importancia como la fuente principal de carbono para la productividad primaria. Sin embargo, este marcador mostró no ser útil en el caso del perifiton, además de mostrar limitaciones para el caso de macrófitas emergentes.

Ambos parámetros isotópicos permitieron determinar la distribución espacial del proceso de eutrofización, con dos etapas bien diferenciadas y establecer que este es un proceso exclusivo que permanece dentro de la bahía y cuyo alcance no ha superado la isla de Pariti. Aún más, éstos permitieron observar procesos muy tempranos de enriquecimiento orgánico para el caso de Huatajata, donde el medio no presenta cambios apreciables o variaciones tan dramáticas como en el caso de Bahía Cohana.

Finalmente, los parámetros isotópicos de carbono y nitrógeno probaron ser muy útiles como herramientas que permiten monitorear procesos de eutrofización y rastrear el origen del aporte de nutrientes que llega a Bahía Cohana y otras zonas del lago menor.

## **5.1. Recomendaciones**

La toma de muestras para el análisis isotópico de carbono y nitrógeno no presenta demasiadas dificultades. Sin embargo, es importante mencionar algunas consideraciones. En primer lugar, el encapsulado de las muestras para la medición isotópica en el IRMS es de considerable importancia y debe ser realizada con paciencia y precisión. Cada cápsula individual debe estar apropiadamente sellada y poseer una forma en lo posible esférica. Para esto es recomendable utilizar pinzas de punta gruesa y con estrías en los extremos internos, para facilitar la manipulación y formación de las esferas de estaño. Las placas de inmuno-ensayo de 96 pozos donde van las muestras deben estar apropiadamente selladas y aseguradas para su transporte. La técnica de decarbonatación (en caso de querer realizar los análisis sólo en la fase orgánica de las muestras) puede arrojar resultados anómalos de composición isotópica si no se la realiza de manera correcta y precisa.

En segundo lugar, el muestreo de sedimentos - para los intereses enmarcados en la tesis o similares, - debe ser realizado con cautela y, en caso de no conocerse la tasa de sedimentación de los mismos, es preferible tomar muestras de los centímetros de sedimento más superficiales, para evitar cualquier efecto de atenuación temporal.

## **6. AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer primeramente a todo el personal del Laboratorio de Calidad Ambiental del Instituto de Ecología donde se llevó a cabo toda la parte de la preparación y tratamiento de las muestras. Agradezco todo el apoyo brindado y la colaboración personal y desinteresada de cada uno de los técnicos y profesionales que hicieron posible la realización de esta tesis. Agradezco también el entrenamiento y acceso cordial que me dieron para el uso de sus equipos.

En segundo lugar, quiero agradecer y resaltar el apoyo del Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD) del gobierno francés en la realización de este trabajo. La prestación y apoyo con equipos, transporte y personal fueron de vital importancia para la realización de este trabajo.

Finalmente, pero no por eso menos importante, quiero agradecer la inmensa contribución y apoyo de mi tutor Darío Achá y de mi asesor David Point en la realización de este trabajo. Estoy particularmente agradecido por la paciencia y el entrenamiento al momento de realizar la toma de muestras y los análisis en laboratorio. De igual manera su contribución como guías y mentores a lo largo de este trabajo ha sido simplemente invaluable.

## 7. BIBLIOGRAFÍA. -

- Aitkenhead-Peterson, J. A., M. K. Steele, et al. (2009). "Dissolved organic carbon and nitrogen in urban and rural watersheds of south-central Texas: land use and land management influences." Biogeochemistry**96**: 119-129.
- Anderson, D. M., P. M. Glibert, et al. (2002). "Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences." Estuaries and Coasts**25**(4): 704-726.
- Backer, L. C. and D. J. McGillicuddy Jr. (2006). "Harmful algal blooms." Oceanography**19**(2): 94-106.
- Bade, D. L., S. R. Carpenter, et al. (2007). "Sources and fates of dissolved organic carbon in lakes as determined by whole-lake carbon isotope additions." Biogeochemistry**84**: 115-129.
- Bergfur, J., R. K. Johnson, et al. (2009). "Effects of nutrient enrichment on C and N stable isotope ratios of invertebrates, fish and their food resources in boreal streams." Hydrobiologia**628**(1): 67-79.
- Boller, A. J., P. J. Thomas, et al. (2011). "Low stable carbon isotope fractionation by coccolithophore RubisCO." Geochimica et Cosmochimica Acta**75**(22): 7200-7207.
- Boller, A. J., P. J. Thomas, et al. (2015). "Isotopic discrimination and kinetic parameters of RubisCO from the marine bloom-forming diatom, *Skeletonema costatum*." Geobiology**13**(1): 33-43.
- Bontes, B. M., R. Pel, et al. (2006). "The effects of biomanipulation on the biogeochemistry, carbon isotopic composition and pelagic food web relations of a shallow lake." Biogeosciences**3**: 69-83.
- Boulangé, B. and E. Aquize (1981). "Morphologie, hydrographie et climatologie du lac Titicaca et de son bassin versant." Revue D'hydrobiologie Tropicale**14**(4): 269-287.
- Boutton, T. W. (1996). Stable Carbon Isotope Ratios of Soil Organic Matter and Their Use as Indicators of Vegetation and Climate Change. Mass Spectrometry of Soils. T. W. Boutton and S. Yamasaki. New York, Marcel Dekker, Inc.: 47-82.
- Bronk, D. A., J. H. See, et al. (2007). "DON as a source of bioavailable nitrogen for phytoplankton." Biogeosciences**4**: 283-296.
- Bryhn, A. C. and L. Hakanson (2009). "Eutrophication: Model Before Acting." Science**324**: 723.
- Cabana, G. and J. B. Rasmussen (1996). "Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**93**(20): 10844-10847.
- Cadima, M., E. Fernández, et al. (2005). Algas de Bolivia, con énfasis en el fitoplancton. Importancia, ecología, aplicaciones y distribución de géneros, Centro de Ecología Simón I. Patiño.
- Cai, W. J., X. Hu, et al. (2011). "Acidification of subsurface coastal waters enhanced by eutrophication." Nature Geoscience**4**: 766-770.
- Canfield, D. E., A. N. Glazer, et al. (2010). "The evolution and future of Earth's nitrogen cycle." Science**330**: 192-196.
- Canfield, D. E., B. Thamdrup, et al. (2005). Aquatic Geomicrobiology. New York, El Sevier Academic Press.

- Carmouze, J. and E. Aquize (1981). "La régulation hydrique du lac Titicaca et l'hydrologie de ses tributaires." Revue D'hydrobiologie Tropicale**14**(4): 311-328.
- Cassar, N., E. A. Laws, et al. (2004). "Bicarbonate uptake by Southern Ocean phytoplankton." Global Biogeochemical Cycles**18**(2): 1-10.
- Cleveland, C. C., A. R. Townsend, et al. (1999). "Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in natural ecosystems." Global Biogeochemical Cycles**13**(2): 623-645.
- Cloern, J. E. (2001). "Our Evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem." Marine Ecology Progress Series**210**: 223-253.
- Cofala, J., M. Amann, et al. (2007). "Scenarios of global anthropogenic emissions of air pollutants and methane until 2030." Atmospheric Environment**41**(38): 8486-8499.
- Cole, J. J., S. R. Carpenter, et al. (2002). "Pathways of organic carbon utilization in small lakes: Results from a whole-lake <sup>13</sup>C addition and coupled model." Limnology and Oceanography**47**(6): 1664-1675.
- Cole, M. L., I. Valiela, et al. (2004). "Assesment of a  $\delta^{15}\text{N}$  isotopic method to indicate anthropogenic Eutrophication in Aquatic Ecosystems." Journal of Environmental Quality**33**(1): 124-132.
- Collot, D., F. Koriyama, et al. (1983). "Répartitions, biomasses et productions des macrophytes du lac Titicaca." Revue D'hydrobiologie Tropicale**16**(3): 241-261.
- Conley, D. J., H. W. Paerl, et al. (2009). "Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus." Science**323**: 1014-1015.
- Craig, H. (1953). "The geochemistry of the stable carbon isotopes." Geochimica et Cosmochimica Acta**3**: 53-92.
- Chiqui, F. R. F. (2001). Evaluación del Río Pallina, en relación a su calidad de aguas en la zona urbana de Viacha. Instituto de Ecología - UMSA. La Paz, Universidad Mayor de San Andrés. **Postgrado**: 109pp.
- Chorus, I. and J. Bartram, Eds. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, World Health Organization.
- Chudnoff, S. M. (2009). A water quality assessment of the Rio Katari River and its principle tributaries, Bolivia. New Mexico Institute of Mining and Technology. Albuquerque, University of New Mexico. **Master in Water Resources**: 143pp.
- Davidson, E. A., M. Keller, et al. (2000). "Testing a conceptual model of soil emissions of nitrous and nitric oxides." BioScience**50**(8): 667-680.
- Dawson, T. E. and P. D. Brooks (2001). Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. Stable Isotope Techniques in the Study of Biological Processes and Functioning of Ecosystems. M. Unkovich, J. Pate, A. McNeill and D. J. Gibbs. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 1-18.
- de Kluijver, A., J. Ning, et al. (2015). "Macrophytes and periphyton carbon subsidies to bacterioplankton and zooplankton in a shallow eutrophic lake in tropical China." Limnology and Oceanography**60**(2): 375-385.
- de Kluijver, A., P. L. Schoon, et al. (2014). "Stable carbon isotope biogeochemistry of lakes along a trophic gradient." Biogeosciences**11**: 6265-6276.
- Dejoux, C. and A. Iltis, Eds. (1991). El Lago Titicaca: Síntesis del conocimiento limnológico actual. La Paz, ORSTROM-HISBOL.
- DeNiro, M. and S. Epstein (1978). "Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals." Geochimica et Cosmochimica Acta**42**(5): 495-506.

- Dore, J. E., B. N. Popp, et al. (1998). "A large source of atmospheric nitrous oxide from subtropical North Pacific surface waters." Nature**396**: 63-66.
- Drew, S., I. Flett, et al. (2008). "The trophic history of Myall Lakes, New South Wales, Australia: interpretations using  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  of the sedimentary record." Hydrobiologia**608**(1): 35-47.
- Epstein, H. E., I. C. Burke, et al. (2001). "Plant effects on nitrogen retention in shortgrass steppe two years after  $^{15}\text{N}$  addition." Oecología**128**(3): 422-430.
- Fenn, M. E., J. S. Baron, et al. (2003). "Ecological effects of nitrogen deposition in the Western United States." BioScience**53**(4): 404-420.
- Finlay, J. C. (2003). "Controls of streamwater dissolved inorganic carbon dynamics in a forested watershed." Biogeochemistry**62**(3): 231-252.
- Finlay, J. C. and C. Kendall (2007). Stable isotope tracing of temporal and spatial variability in organic matter sources to freshwater ecosystems. Stable isotopes in ecology and environmental science. R. Michener and K. Lajtha, Blackwell Publishing: 283-333.
- Flores, E. and A. Herrero (2005). "Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria." Biochemical Society Transactions**33**: 164-167.
- Fontúrbel, F. (2008). Contaminación ambiental y cultural en el Lago Titikaka: estado actual y perspectivas. La Paz, Publicaciones Integrales - Fundación emegece.
- Fontúrbel, F., C. I. Molina, et al. (2006). "Evaluación rápida de la diversidad de fitoplancton en aguas eutróficas del Lago Titicaca (Bolivia) y su uso como indicador del grado de contaminación." Ciencia Abierta Internacional**29**(1): 1-12.
- Fontúrbel, R. F. (2003). "Algunos criterios biológicos sobre el proceso de eutrofización a orillas de seis localidades del Lago Titicaca." Ecología Aplicada**2**(1): 75-79.
- Fontúrbel, R. F. (2005a). "Evaluación preliminar de la calidad hídrica, mediante indicadores fisicoquímicos y biológicos, en la Bahía de Cohana, Lago Titikaka, (Departamento de La Paz, Bolivia)." Ciencia Abierta Internacional**28**: 13pp.
- Fontúrbel, R. F. (2005b). "Indicadores fisico-químicos y biológicos del proceso de eutrofización del Lago Titikaka (Bolivia)." Ecología Aplicada**4**(1,2): 135-141.
- Fontúrbel, R. F. (2005c). "Relevamiento ecoturístico rápido de la Bahía de Cohana, lago Titikaka (Departamento de La Paz, Bolivia)." Ciencia Abierta Internacional**28**: 1-12.
- France, R. (1996). "Carbon isotope ratios in logged and unlogged boreal forests: Examination of the potential for determining wildlife habitat use." Environmental Management**20**(2): 249-255.
- France, R. (2000). "Comparing  $\delta^{13}\text{C}$  among littoral foodwebs using lake DOC." Aquatic Ecology**34**(4): 445-448.
- Freing, A., D. W. R. Wallace, et al. (2012). "Global oceanic production of nitrous oxide." Philosophical Transactions of the Royal Society B**367**: 1245-1255.
- Frenguelli, J. (1937). Diatomeas del Lago Titicaca. Boletín del Museo de Historia Natural "Javier Prado". Argentina: 14-25.
- Freudenthal, T., T. Wagner, et al. (2001). "Early diagenesis of organic matter from sediments of the eastern subtropical Atlantic Evidence from stable nitrogen and carbon isotopes." Geochimica et Cosmochimica Acta**65**(11): 1795-1808.
- Fry, B. (1996). " $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation by marine diatoms." Marine Ecology - Progress Series**134**: 283-294.
- Fry, B. (2006). Stable Isotope Ecology. New York, Springer-Verlag.

- Fry, B. and E. B. Sherr (1984). "<sup>13</sup>C measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems." Contributions to Marine Science**27**: 13-47.
- Gälman, V., J. Rydberg, et al. (2009). "Decadal diagenetic effects on  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  in varved lake sediment." Limnology and Oceanography**54**(3): 917-924.
- Galloway, J. N. (1998). "The global nitrogen cycle: changes and consequences." Environmental Pollution**102**(1): 15-24.
- Galloway, J. N., J. D. Aber, et al. (2003). "The nitrogen cascade." BioScience**53**(4): 341-356.
- Galloway, J. N. and E. B. Cowling (2002). "Reactive nitrogen and the World: two hundred years of change." Ambio**31**(2): 64-71.
- Galloway, J. N., E. B. Cowling, et al. (2002). "Reactive nitrogen: Too much of a good thing?" Ambio**31**(2): 60-63.
- Galloway, J. N., F. J. Dentener, et al. (2004). "Nitrogen cycles: past, present and future." Biogeochemistry**70**: 153-226.
- Galloway, J. N., W. H. Schlesinger, et al. (1995). "Nitrogen fixation: anthropogenic enhancement-environmental response." Global Biogeochemical Cycles**9**(2): 235-252.
- Galloway, J. N., A. R. Townsend, et al. (2008). "Transformation of the Nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions." Science**320**: 889-892.
- Garreaud, R. and P. Aceituno (2001). "Interannual Rainfall Variability over the South American Altiplano." American Meteorological Society**14**: 2779-2789.
- Glibert, P. M., D. M. Anderson, et al. (2005). "The global, complex phenomena of harmful algal blooms." Oceanography**18**(2): 130-141.
- Goericke, R., J. P. Montoya, et al. (1994). Physiology of isotopic fractionation in algae and cyanobacteria. Stable isotopes in ecology and environmental science. R. Michener and K. Lajtha, Blackwell Scientific Publications: 187-221.
- Goodale, C. L., J. D. Aber, et al. (2000). "The long-term effects of disturbance on organic and inorganic nitrogen export in the White Mountains, New Hampshire." Ecosystems**3**(5): 433-450.
- Granger, J., D. M. Sigman, et al. (2008). "Nitrogen and oxygen isotope fractionation during dissimilatory nitrate reduction by denitrifying bacteria." Limnology and Oceanography**53**(6): 2533-2545.
- Gruber, N. and J. N. Galloway (2008). "An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle." Nature**451**: 293-296.
- Guerlesquin, M. (1991). Las carofíceas. El lago Titicaca: síntesis del conocimiento limnológico actual. C. Dejoux and A. Iltis, ORSTROM-HISBOL: 241-249.
- Heaton, T. H. E. (1986). "Isotopic studies of nitrogen pollution in the hydrosphere and atmosphere: a review." Chemical Geology**56**: 87-102.
- Hedin, L. O., J. J. Armesto, et al. (1995). "Patterns of nutrient loss from unpolluted, old-growth temperate forests: evaluation of biogeochemical theory." Ecology**76**: 493-509.
- Heisler, J., P. M. Glibert, et al. (2008). "Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus." Harmful Algae**8**: 3-13.
- Herridge, D. F., M. B. Peoples, et al. (2008). "Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems." Plant and Soil**311**(1-2): 1-18.
- Hilton, J., M. O'Hare, et al. (2006). "How green is my river? A new paradigm of eutrophication in rivers." Science of the Total Environment**365**: 66-83.

- Hill, W. R., S. E. Fanta, et al. (2008). "<sup>13</sup>C dynamics in benthic algae: Effects of light, phosphorus and biomass development." Limnology and Oceanography**53**(4): 1217-1226.
- Hill, W. R. and R. G. Middleton (2006). "Changes in carbon stable isotope ratios during periphyton development." Limnology and Oceanography**51**(5): 2360-2369.
- Hodell, D. A. and C. L. Schelske (1998). "Production, sedimentation and isotopic composition of organic matter in Lake Ontario." Limnology and Oceanography**43**(2): 200-214.
- Hoefs, J. (2009). "Stable Isotope Geochemistry." **Sixth Edition**: 281.
- Hoekstra, A. Y. and M. M. Mekonnen (2011). "The water footprint of humanity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**109**(9): 3232-3237.
- Howarth, R. W., H. S. Jensen, et al. (1995). Transport to and processing of P in near-shore and oceanic waters. Phosphorus in the global environment. H. Tiessen. New York, Wiley: 323-345.
- Howarth, R. W. and R. Marino (2006). "Nitrogen as the limiting nutrient for eutrophication in coastal marine ecosystems: Evolving views over three decades." Limnology and Oceanography**51**(1): 364-376.
- Huisman, J., C. P. Matthijs, et al., Eds. (2005). Harmful Cyanobacteria. Aquatic Ecology Series, Springer.
- Hutchinson, G. E. (1973). "Eutrophication: The Scientific background of a contemporary practical problem." American Scientist**61**(3): 269-279.
- Iltis, A. (1991a). Estudio florístico general. El lago Titicaca: síntesis del conocimiento limnológico actual. C. Dejoux and A. Iltis, ORSTROM-HISBOL: 193-197.
- Iltis, A. (1991b). Aspecto cuantitativo y poblaciones. El lago Titicaca: síntesis del conocimiento limnológico actual. C. Dejoux and A. Iltis, ORSTROM-HISBOL: 199-210.
- Iltis, A. and P. Mourguiart (1991). Repartición y biomasas. El lago Titicaca: síntesis del conocimiento limnológico actual. C. Dejoux and A. Iltis, ORSTROM-HISBOL: 254-265.
- Ishida, K. I. and B. R. Green (2002). "Second- and third-hand chloroplasts in dinoflagellates: Phylogeny of oxygen-evolving enhancer 1 (PsbO) protein reveals replacement of a nuclear-encoded plastid gene by that of a haptophyte tertiary endosymbiont." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**99**(14): 9294-9299.
- Jacoby, C. A. and T. K. Frazer (2009). "Eutrophication: Time to Adjust Expectations." Science**324**: 723-724.
- Jones, R. I., L. King, et al. (2004). "Nitrogen stable isotope ratios in surface sediments, epilithon and macrophytes from upland lakes with differing nutrient status." Freshwater Biology**49**(4): 382-391.
- Kemp, W. M., W. R. Boynton, et al. (2005). "Eutrophication of Chesapeake Bay: historical trends and ecological interactions." Marine Ecology - Progress Series**303**: 1-29.
- Kendall, C., E. Elliot, et al. (2007). Tracing anthropogenic inputs of nitrogen to ecosystems. Stable isotopes in ecology and environmental science. R. Michener and K. Lajtha, Blackwell Publishing: 375-449.

- Kenney, W. F., M. Brenner, et al. (2010). "Identifying sources of organic matter in sediments of shallow lakes using multiple geochemical variables." Journal of Paleolimnology**44**(1): 1039-1052.
- Lake, J. L., R. A. McKinney, et al. (2001). "Stable nitrogen isotopes as indicators of anthropogenic activities in small freshwater systems." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**58**(5): 870-878.
- Lambert, T., A. C. Pierson-Wickmann, et al. (2011). "Carbon isotopes as tracers of dissolved organic carbon sources and water pathways in headwater catchments." Journal of Hydrology**402**(3-4): 228-238.
- Lazzaro, J. (1981). "Biomasses, peuplements phytoplanctoniques et production primaire du lac Titicaca." Revue D'hydrobiologie Tropicale**14**(4): 349-384.
- Lehmann, M. F., P. Reichert, et al. (2003). "Modelling nitrogen and oxygen isotope fractionation during denitrification in a lacustrine redox-transition zone." Geochimica et Cosmochimica Acta**67**(14): 2529-2542.
- Lewis, W. M. J. (2002). "Estimation of background nitrogen yields for North America by use of benchmark watersheds." Biogeochemistry**57-58**: 375-385.
- Lewis, W. M. J., J. M. Melack, et al. (1999). "Nitrogen yields from undisturbed watersheds in the Americas." Biogeochemistry**46**(1-3): 149-162.
- Liao, X. and P. W. Inglett (2012). "Biological Nitrogen Fixation in Periphyton of Native and Restored Everglades Marl Prairies." Wetlands**32**(1): 137-148.
- Lipson, D. A. and T. Näsholm (2001). "The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems." Oecología**128**(3): 305-316.
- Liu, E., J. Shen, et al. (2010). "A geochemical record of recent anthropogenic nutrient loading and enhanced productivity in Lake Nansihu, China." Journal of Paleolimnology**44**(1): 15-24.
- Liu, Y., G. Villalba, et al. (2008). "Global phosphorus flows and environmental impacts from a consumption perspective." Journal of Industrial Ecology**12**(2): 229-247.
- Lorini, J. A., D. M. Chavez, et al. (2011). Contexto geográfico, histórico, demográfico y socioeconómico. Perspectivas del Medio Ambiente en el sistema Titicaca-Desaguadero-Poopó-Salar de Coipasa (TDPS), Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA): 20-45.
- Mainstone, C. P. and W. Parr (2002). "Phosphorus in rivers - ecology and management." Science of the Total Environment**282-283**: 25-47.
- Mariotti, A., J. C. Germon, et al. (1981). "Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: Some principles; illustration for the denitrification and nitrification processes." Plant and Soil**62**: 413-430.
- Marshall, J. D., J. R. Brooks, et al. (2007). Sources of variation in the stable isotopic composition of plants. Stable isotope tracing of temporal and spatial variability in organic matter sources to freshwater ecosystems. R. Michener and K. Lajtha, Blackwell Publishing: 22-60.
- McClelland, J. W. and I. Valiela (1998). "Linking nitrogen in estuarine producers to land-derived sources." Limnology and Oceanography**43**(3): 577-585.
- McClelland, J. W., I. Valiela, et al. (1997). "Nitrogen-stable isotope signatures in estuarine food webs: A record of increasing urbanization in coastal watersheds." Limnology and Oceanography**42**(5).
- Michener, R. and K. Lajtha, Eds. (2007). Stable Isotopes in ecology and environmental science. Ecological Methods and Concepts Series, Blackwell Publishing.

- Miller, T. W., K. Omori, et al. (2010). "Tracing anthropogenic inputs to production in the Seto Inland Sea, Japan - A stable isotope approach." Marine Pollution Bulletin**60**(10): 1803-1809.
- Minagawa, M. and E. Wada (1984). "Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food chains: further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age." Geochimica et Cosmochimica Acta**48**(5): 1135-1140.
- Molina, J. and F. Satgé (2014). Los Recursos Hídricos del Sistema TDPS. Línea base de conocimientos sobre los recursos hidrológicos e hidrobiológicos en el sistema TDPS con enfoque en la cuenca del Lago Titicaca. M. Pouilly, X. Lazzaro, D. Point and M. Aguirre. Quito, IRD-UICN: 23-47.
- Montes de Oca, I. (2005). Enciclopedia Geográfica de Bolivia. La Paz, Bolivia, Atenea.
- Morales, M. S., D. A. Christie, et al. (2012). "Precipitation changes in the South American Altiplano since 1300 AD reconstructed by tree rings." Climate of the Past Discussions**7**(6): 4297-4334.
- Navarro, G. and M. Maldonado (2002). Geografía Ecológica de Bolivia: Vegetación y Ambientes Acuáticos. Cochabamba, Centro de Ecología Simón I. Patiño.
- Neff, J. C., F. S. I. Chapin, et al. (2003). "Breaks in the cycle: dissolved organic nitrogen in terrestrial ecosystems." Frontiers in Ecology and the Environment**1**: 205-211.
- Nixon, S. W. (1995). "Coastal Marine Eutrophication: A definition, social causes and future concerns." Ophelia**41**: 199-219.
- Nobelprize.org. "The Nobel Prize in Chemistry 1922." Media AB 2014. Web. 30 Sep 2014. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1922/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1922/).
- Nolan, B. T. (2001). "Relating nitrogen sources and aquifer susceptibility to nitrate in shallow groundwaters of the United States." Groundwater**39**(2): 290-299.
- Oki, T. and S. Kanae (2006). "Global Hydrological cycles and World Water Resources." Science**313**: 1068-1072.
- Paduano, G. M., M. B. Bush, et al. (2003). "A Vegetation and Fire History of Lake Titicaca since the Last Glacial Maximum." Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**194**(1-3): 259-279.
- Paerl, H. W. and T. G. Otten (2013). "Harmful cyanobacterial blooms: causes, consequences, and controls." Microbial Ecology**65**(4): 995-1010.
- Parker, S. R., S. R. Poulson, et al. (2010). "Temporal variability in the concentration and stable carbon isotope composition of Dissolved Inorganic and Organic Carbon in two Montana, USA rivers." Aquatic Geochemistry**16**(1): 61-84.
- Perakis, S. S. and L. O. Hedin (2002). "Nitrogen loss from unpolluted South American forests mainly via dissolved organic compounds." Nature**415**: 416-419.
- Peterson, B. and B. Fry (1987). "Stable Isotopes in Ecosystem Studies." Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**18**: 293-320.
- Peterson, B. J., W. M. Wollheim, et al. (2001). "Control of nitrogen export from watersheds by headwater streams." Science**292**(5514): 86-90.
- Pierson-Wickmann, A. C., G. Gruau, et al. (2011). "Development of a combined isotopic and mass-balance approach to determine dissolved organic carbon sources in eutrophic reservoirs." Chemosphere**83**: 356-366.
- Pouilly, M., X. Lazzaro, et al. (2014). Línea base de conocimientos sobre los recursos hidrológicos e hidrobiológicos en el sistema TDPS con enfoque en la cuenca del Lago Titicaca, IRD-UICN.

- Quentin Grafton, R., J. Pittock, et al. (2013). "Global insights into water resources, climate change and governance." Nature Climate Change**3**: 315-321.
- Quintanilla, J. and I. Quino (2014). Hidroquímica de la Cuenca Endorreica del Altiplano (Sistema TDPS). Línea base de conocimientos sobre los recursos hidrológicos e hidrobiológicos en el sistema TDPS con enfoque en la cuenca del Lago Titicaca. Quito, IRD-UICN. **1**: 40-80.
- Raynal-Roques, A. (1991). Las Plantas Superiores. El lago Titicaca: síntesis del conocimiento limnológico actual. C. Dejoux and A. Iltis, ORSTROM-HISBOL: 233-239.
- Ribera, M. O. (2008). La Hiper-contaminación De La Bahía De Cohana. La Paz, Bolivia, Liga de Defensa del Medio Ambiente - LIDEMA.
- Ribera, M. O. (2010). La Bahía de Cohana: Actualización 2009-2010. La Paz, Bolivia, Liga de Defensa del Medio Ambiente - LIDEMA.
- Rich, J. J., O. R. Dale, et al. (2008). "Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in Chesapeake Bay sediments." Microbial Ecology**55**(2): 311-320.
- Roberts, P. J. W. and B. Villegas (2007). Water Quality in Lake Titicaca: Data and Modeling, The World Bank: 78pp.
- Robertson, G. P. and P. M. Vitousek (2009). "Nitrogen in agriculture: Balancing the cost of an essential resource." Annual Review of Environment and Resources**34**: 97-125.
- Robinson, J. J., K. M. Scott, et al. (2003). "Kinetic isotope effect and characterization of form II RubisCO from the chemoautotrophic endosymbionts of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*." Limnology and Oceanography**48**(1): 48-54.
- Roche, M. A., J. Bourges, et al. (1991). Climatología e hidrología de la cuenca del lago Titicaca. El Lago Titicaca: Síntesis del conocimiento limnológico actual. C. Dejoux and A. Iltis, ORSTROM-HISBOL: 83-107.
- Ronchail, J., J. C. Espinoza, et al. (2014). Evolución del nivel del Lago Titicaca durante el siglo XX. Línea base de conocimientos sobre los recursos hidrológicos e hidrobiológicos en el sistema TDPS con enfoque en la cuenca del Lago Titicaca. M. Pouilly, X. Lazzaro, D. Point and M. Aguirre. Quito, IRD-UICN: 10-22.
- Salmaso, N. (2010). "Long-term phytoplankton community changes in a deep subalpine lake: responses to nutrient availability and climatic fluctuations." Freshwater Biology**55**(4): 825-846.
- Savage, C. and R. Elmgren (2004). "Macroalgal (*Fucus vesiculosus*)  $\delta^{15}\text{N}$  values trace decrease in sewage influence." Ecological Applications**14**(2): 517-526.
- Scott, J. T., R. D. Doyle, et al. (2007). "The role of  $\text{N}_2$  fixation in alleviating N limitation in wetland metaphyton: enzymatic, isotopic and elemental evidence." Biogeochemistry**84**(2): 207-218.
- Scott, K. M., J. Schwedock, et al. (2004). "Influence of form IA RubisCO and environmental dissolved inorganic carbon on the  $\delta^{13}\text{C}$  of the clam-chemoautotroph symbiosis *Solemya velum*." Environmental Microbiology**6**(12): 1210-1219.
- Schelske, C. L. (2009). "Eutrophication: Focus on Phosphorus." Science**324**: 722.
- Schindler, D. W. (1974). "Eutrophication and recovery in Experimental Lakes: Implications for lake management." Science**184**: 897-899.
- Schindler, D. W. (1977). "Evolution of phosphate limitation in lakes: natural mechanisms compensate for deficiencies of nitrogen and carbon in eutrophied lakes." Science**195**: 260-262.

- Schindler, D. W. (2006). "Recent advances in the understanding and management of eutrophication." Limnology and Oceanography**51**(1): 356-363.
- Schindler, D. W., F. A. J. Armstrong, et al. (1971). "Eutrophication of lake 227, Experimental Lakes Area, Northwestern Ontario, by addition of phosphate and nitrate." Journal of Research Board of Canada**28**(11): 1763-1782.
- Schindler, D. W. and R. E. Hecky (2009). "Eutrophication: More Nitrogen Data Needed." Science**324**: 721-722.
- Schindler, D. W., R. E. Hecky, et al. (2008). "Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**105**(32): 11254-11258.
- Schindler, D. W., H. Kling, et al. (1973). "Eutrophication of Lake 227 by addition of phosphate and nitrate: The second, third and fourth years of enrichment 1970, 1971 and 1972." Journal of Research Board of Canada**30**: 1415-1440.
- Schlesinger, W. H. and E. S. Bernhardt (2013). Biogeochemistry: An analysis of Global Change, Elsevier.
- Schoeller, D. A. (1999). "Isotope Fractionation: Why Aren't We What We Eat?" Journal of Archaeological Science**26**: 667-673.
- Servant-Vildary, S. (1991). Las diatomeas. El lago Titicaca: síntesis del conocimiento limnológico actual. C. Dejoux and A. Iltis, ORSTROM-HISBOL: 181-191.
- Singleton, M., K. Woods, et al. (2005). "Tracking Sources of Unsaturated Zone and Groundwater Nitrate Contamination Using Nitrogen and Oxygen Stable Isotopes at the Hanford Site, Washington." Environmental Science and Technology**39**: 3563-3570.
- Skei, J., P. Larsson, et al. (2000). "Eutrophication and contaminants in aquatic ecosystems." Ambio**29**(4): 184-194.
- Smil, V. (1999). "Nitrogen in crop production: an account of global flows." Global Biogeochemical Cycles**13**(2): 647-662.
- Smil, V. (2002). "Nitrogen and food production: proteins for human diets." Ambio**31**(2): 126-131.
- Smil, V. (2004). Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosch and the transformation of world food production. Cambridge, MIT press.
- Smith, V. H. (1998). Cultural eutrophication of inland, estuarine and coastal waters. Successes, Limitations and Frontiers in Ecosystem Science. M. J. Pace and P. M. Groffman. New York, Springer: 7-49.
- Smith, V. H. (2003). "Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem." Environmental Science and Pollution Research**10**(2): 126-139.
- Smith, V. H. (2006). "Responses of estuarine and coastal marine phytoplankton to nitrogen and phosphorus enrichment." Limnology and Oceanography**51**(1): 377-384.
- Smith, V. H., S. B. Joye, et al. (2006). "Eutrophication of freshwater and marine ecosystems." Limnology and Oceanography**51**(1): 351-355.
- Smith, V. H. and D. W. Schindler (2009). "Eutrophication science: where do we go from here?" Trends in Ecology and Evolution**24**(4): 201-207.
- Sondergaard, M., J. P. Jensen, et al. (2001). "Retention and internal loading of Phosphorus in shallow, eutrophic lakes." The Scientific World**1**: 427-442.
- Song, G., X. Zhao, et al. (2014). "Nitrogen isotopic fractionation related to nitrification capacity in agricultural soils." Pedosphere**24**(2): 186-195.

- Staal, M., R. Thar, et al. (2007). "Different carbon isotope fractionation patterns during the development of phototrophic freshwater and marine biofilms." Biogeosciences**4**(4): 613-626.
- Stanley, E. H., S. M. Powers, et al. (2012). "Contemporary changes in dissolved organic carbon (DOC) in human dominated rivers: is there a role for DOC management?" Freshwater Biology**57**(1): 26-42.
- Sulzman, E. W. (2007). Stable isotope chemistry and measurement: a primer. Stable isotopes in ecology and environmental science. R. Michener and K. Lajtha, Blackwell Publishing: 1-21.
- Tabita, F. R., T. E. Hanson, et al. (2007). "Function, structure and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs." Microbiology and Molecular Biology Reviews**71**(4): 576-599.
- Tan, F. C., D. L. Cai, et al. (1991). "Carbon isotope geochemistry of the Changjiang estuary." Estuarine, Coastal and Shelf Science**32**(4): 395-403.
- Tank, J. L., J. L. Meyer, et al. (2000). "Analysis of nitrogen cycling in a forest stream during autumn using a <sup>15</sup>N-tracer addition." Limnology and Oceanography**45**(5): 1013-1029.
- UNESCO (2009). World Water Assessment Program. The United Nations World Water Development Report 3: Water in a changing world. London, UNESCO.
- Vadeboncoeur, Y., E. Jeppesen, et al. (2003). "From Greenland to green lakes: Cultural eutrophication and the loss of benthic pathways in lakes." Limnology and Oceanography**48**(4): 1408-1418.
- Vahtera, E., D. J. Conley, et al. (2007). "Internal ecosystem feedbacks enhance nitrogen-fixing cyanobacteria blooms and complicate management in the Baltic Sea." Ambio**36**(2): 186-194.
- van Egmond, K., T. Bresser, et al. (2002). "The European nitrogen case." Ambio**31**(2): 72-78.
- Vander Zanden, M. J. and J. B. Rasmussen (1999). "Primary consumer  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  and the trophic position of aquatic consumers." Ecology**80**: 1395-1404.
- Vander Zanden, M. J. and J. B. Rasmussen (2001). "Variation in  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  trophic fractionation: implications for aquatic food web studies." Limnology and Oceanography**46**(8): 2061-2066.
- Vitousek, P. M., J. D. Aber, et al. (1997a). "Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences." Ecological Applications**7**(3): 737-750.
- Vitousek, P. M. and R. W. Howarth (1991). "Nitrogen limitation on land and in the Sea: How can it occur?" Biogeochemistry**12**(2): 87-115.
- Vitousek, P. M., H. A. Mooney, et al. (1997b). "Human Domination of Earth's ecosystems." Science**277**(5325): 494-499.
- Vitousek, P. M., R. Naylor, et al. (2009). "Nutrient imbalances in agricultural development." Science**324**: 1519-1520.
- von Liebig, J. (1855). Principles of agricultural chemistry with special reference to the late researches made in England. Cycles of Essential Elements. Benchmark Papers in Ecology. L. R. Pomeroy, Dowden, Hutchinson and Ross. **I**: 11-28.
- Vreca, P. and G. Muri (2006). "Changes in accumulation of organic matter and stable carbon and nitrogen isotopes in sediments of two Slovenian mountain lakes (Lake Ledvica and Lake Planina), induced by eutrophication changes." Limnology and Oceanography**51**(1): 781-790.

- Vuorio, K., M. Meili, et al. (2006). "Taxon-specific variation in the stable isotopic signatures ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ) of lake phytoplankton." Freshwater Biology**51**(5): 807-822.
- Wallace, R. B., H. Baumann, et al. (2014). "Coastal ocean acidification: the other eutrophication problem." Estuarine, Coastal and Shelf Science**148**: 1-13.
- Wang, F., C. Liu, et al. (2009). "Stable Isotopes in Sedimentary Organic Matter from Lake Dianchi and their Indication of Eutrophication History." Water, Air, and Soil Pollution**199**(1): 159-170.
- Wirrmann, D. (1991). Morfología y batimetría. El Lago Titicaca: Síntesis del conocimiento limnológico actual. C. Dejoux and A. Iltis, ORSTROM-HISBOL: 31-38.
- Wu, J., H. Huang, et al. (2007). "Sedimentary evidence for recent eutrophication in the northern basin of Lake Taihu, China: human impacts on a large shallow lake." Journal of Paleolimnology**38**(1): 13-23.
- Wu, J., L. Lin, et al. (2006). "Organic matter stable isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) response to historical eutrophication of Lake Taihu, China." Hydrobiologia**563**(1): 19-29.
- Wu, Y., J. Zhang, et al. (2003). "Isotope variability of particulate organic matter at the PN section in the East China Sea." Biogeochemistry**65**(1): 31-49.
- Zehr, J. P. and R. M. Kudela (2011). "Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems." Annual Review of Marine Science**3**: 197-225.
- Zohary, T., J. Erez, et al. (1994). "Seasonality of stable carbon isotopes within the pelagic food web of Lake Kinneret." Limnology and Oceanography**39**(5): 1030-1043.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo A

#### A-1. Ciclo del nitrógeno

De todos los elementos necesarios para la vida, el nitrógeno es el más abundante en todo el planeta, incluida la biosfera (Galloway, Aber et al. 2003). Sin embargo y a pesar de su abundancia, casi todo el N se encuentra en forma no reactiva y por tanto, no disponible para la mayoría de los organismos vivos (Galloway, Dentener et al. 2004). Tan solo una pequeña fracción es nitrógeno reactivo (Nr), mientras que el resto se encuentra inmovilizado en las rocas sedimentarias profundas (20 %) o en su forma más inerte en la atmósfera (78 %), como nitrógeno molecular ( $N_2$ ) (Galloway 1998; Zehr and Kudela 2011). La pequeña fracción reactiva que puede interactuar con la biota, incluye un conjunto de formas orgánicas (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y urea entre otros) e inorgánicas ( $NH_3$ ,  $NH_4^+$ , óxidos de N [ $NO_x$ ],  $HNO_3$ ,  $N_2O$  y  $NO_3^-$ ) (Galloway, Aber et al. 2003).

Naturalmente, el Nr se origina a través de dos procesos diferentes. El primero implica las descargas eléctricas durante las tormentas, las cuales fijan entre 3 y 5 teragramos (Tg) de N al año (Galloway, Schlesinger et al. 1995). El segundo proceso es la fijación biológica de nitrógeno (FBN), la cual transforma, en ecosistemas terrestres, entre 90 y 130 Tg de N por año, y en ecosistemas acuáticos entre 40 y 200 Tg de N por año (Galloway, Schlesinger et al. 1995). La FBN es un proceso realizado por procariontas, los cuales pueden reducir el nitrógeno gaseoso ( $N_2$ ) en amonio ( $NH_4^+$ ), mediante la enzima nitrogenasa y la hidrólisis de 16 moléculas de ATP por cada molécula de  $N_2$  fijado (Canfield, Glazer et al. 2010). Pueden ser de vida libre o estar asociados de manera simbiótica con otros organismos, aunque esta última forma (simbiosis con plantas) es la que predomina y representa la mayor parte del N reactivo que se genera durante la fijación (Cleveland, Townsend et al. 1999).

El  $NH_4^+$  y  $NO_3^-$  son las fuentes principales de N para los productores primarios (Canfield, Glazer et al. 2010). Sin embargo, el  $NH_4^+$  es la fuente más favorable debido a que el gasto de energía que los microorganismos deben realizar para su transporte y asimilación es menor (Zehr and Kudela 2011). Aunque las formas orgánicas nitrogenadas (DON) abarcan un conjunto de moléculas estructuralmente diversas (Neff, Chapin et al. 2003), las de pequeño tamaño como la urea y los aminoácidos también son fuentes importantes de N fácilmente asimilable para organismos autótrofos y heterótrofos (Lipson and Näsholm 2001; Bronk, See et al. 2007). Debido a que el  $NH_4^+$  es también el primer producto de la descomposición de la materia orgánica (a través de la amonificación), puede ser fácilmente reciclado para su reincorporación en la cadena trófica (Zehr and Kudela 2011).

El destino, así como los procesos de transformación y ciclado del  $\text{NH}_4^+$  dependen, en términos generales, de la presencia local de oxígeno en los ecosistemas (Canfield, Glazer et al. 2010). El  $\text{NH}_4^+$  puede ser oxidado a  $\text{NO}_3^-$  a través de la nitrificación, un proceso aeróbico de dos etapas realizado por diferentes microorganismos quimioautótrofos por cada etapa (Canfield, Thamdrup et al. 2005). El  $\text{NO}_3^-$  puede ser transformado de vuelta a  $\text{NH}_4^+$  ya sea a través de la reducción asimilatoria o bien mediante la reducción desasimilatoria del nitrato a amonio (DNRA), este último proceso es realizado en ausencia de oxígeno (Canfield, Glazer et al. 2010). Existe además una tercera opción: el  $\text{NO}_3^-$  y otros compuestos oxidados del N pueden ser reducidos a  $\text{N}_2$  a través de la denitrificación (Zehr and Kudela 2011). Tanto la DNRA como la denitrificación son procesos realizados por microorganismos que pueden aprovechar el  $\text{NO}_3^-$  (en el primer caso) u otras formas oxidadas ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$  y  $\text{N}_2\text{O}$  - para el segundo caso) como aceptores de electrones durante la oxidación anaerobia de la materia orgánica (Canfield, Glazer et al. 2010; Zehr and Kudela 2011). Una ruta alternativa que transforma el N fijado en  $\text{N}_2$  es la oxidación anaerobia de amonio (o anammox), el cual es un proceso quimioautotrófico muy particular, que acopla la oxidación de  $\text{NH}_4^+$  con la reducción de  $\text{NO}_2^-$  (Zehr and Kudela 2011). A diferencia de la nitrificación y la denitrificación que producen  $\text{N}_2\text{O}$  (un potente gas de efecto invernadero) (Dore, Popp et al. 1998; Freing, Wallace et al. 2012), ya sea como subproducto o paso intermedio (Canfield, Glazer et al. 2010), el metabolismo anammox es estrictamente una vía de denitrificación sin liberación de  $\text{N}_2\text{O}$  (Rich, Dale et al. 2008).

Antes de la intervención humana al ciclo (a partir de la revolución industrial), el N reactivo que se generaba mediante la FBN no llegaba a acumularse debido a que la mayoría era devuelto a la atmósfera a través de la denitrificación tanto en suelos y sedimentos como en aguas subterráneas y estuarios (Galloway, Aber et al. 2003). El poco N reactivo que no retornaba a la atmósfera era, o bien rápidamente incorporado e inmovilizado por la biota durante largos periodos de tiempo (los ecosistemas como bosques y llanuras pueden llegar a tener tiempos de residencia muy largos) o arrastrado por escorrentía hacia otros ecosistemas (Epstein, Burke et al. 2001; Galloway, Aber et al. 2003). Galloway et al. (1995) estima que el arrastre y movilización pre-industriales del  $\text{N}_r$  por escorrentía a nivel global era de 35 Tg por año.

En ecosistemas terrestres prístinos, sólo una pequeña fracción se pierde en forma orgánica (DON) (Goodale, Aber et al. 2000), mientras que el arrastre inorgánico (DIN) puede variar en función de la historia del ecosistema de donde proviene, aunque en general es también bajo, debido al ciclaje en la porción terrestre que deja poco  $\text{N}_r$  para ser arrastrado (Fenn, Baron et al. 2003). El  $\text{N}_r$  que alcanza los ríos y afluentes es rápidamente denitrificado o incorporado por los productores primarios a lo largo de la cadena trófica, donde es reciclado continuamente (Peterson, Wollheim et al. 2001). Sin embargo, el flujo de  $\text{N}_r$  desde la tierra al agua es diferente para zonas templadas que para zonas tropicales. En el primer caso, el arrastre es mayoritariamente en forma orgánica (ya sea detritus o materia

orgánica disuelta), mientras que en los trópicos el arrastre se da casi en su totalidad en forma de  $\text{NO}_3^-$  (Lewis, Melack et al. 1999; Lewis 2002; Perakis and Hedin 2002).

## **A-2. Alteraciones del ciclo del nitrógeno**

En la actualidad, ningún ecosistema se encuentra libre de afectación humana, ya sea directa o indirectamente (Vitousek, Mooney et al. 1997b). De toda la superficie de la Tierra que ha sido modificada o está siendo alterada por la actividad humana (alrededor del 60 %), la transformación del uso de la tierra es la perturbación más contundente y la que modifica en mayor medida a los ecosistemas y sus ciclos biogeoquímicos (Vitousek, Mooney et al. 1997b; Vitousek, Naylor et al. 2009). Las alteraciones a los ciclos del C y N son cada vez más importantes debido a su participación como promotores y actores principales del cambio climático (Gruber and Galloway 2008; Schlesinger and Bernhardt 2013).

Las tres actividades humanas que alteran el ciclo del N son: la fijación industrial a partir del N atmosférico a través del proceso Haber-Bosch (enfocado principalmente a la producción de fertilizantes), el incremento en la cantidad y superficie de cultivos con capacidad de fijar N y la quema de combustibles fósiles (Galloway, Schlesinger et al. 1995). La cantidad de Nr en el planeta se incrementó de 15 Tg por año en 1860 a 165 Tg en 2000 y 187 Tg en 2005 (Galloway and Cowling 2002; Galloway, Dentener et al. 2004; Galloway, Townsend et al. 2008), con la característica particular de que se fija 5 veces más N a partir de la producción de alimentos (FBN y fertilizantes) que a través del consumo de carbón, gas y petróleo para energía (Galloway and Cowling 2002). Otras actividades como la quema de biomasa y el desmonte de los bosques son promotores importantes de la liberación y movilización del N acumulado hacia otros ecosistemas (Galloway, Schlesinger et al. 1995). Aunque existen estimaciones cuantitativas sobre la magnitud de los efectos antropogénicos en los flujos regionales y globales de N, todavía existen muchas interrogantes e incertidumbres respecto a ciertos aspectos del ciclo (Galloway, Dentener et al. 2004).

El proceso Haber-Bosch es la forma artificial de fijación industrial que transforma el N atmosférico ( $\text{N}_2$ ) en  $\text{NH}_3$  en presencia de hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) a presiones y temperaturas muy altas (Smil 2004). 85 % del Nr generado a través de este proceso (103 Tg/año en 2004) está destinado para la producción de fertilizantes (Galloway, Cowling et al. 2002; Galloway, Dentener et al. 2004). De todo el Nr que se coloca en los campos de cultivo en forma de fertilizantes, se estima que más del 70% se pierden hacia la atmósfera, en el transcurso de un año, en forma de gases de  $\text{NO}_x$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$  o a través de infiltración y escorrentía hacia los ríos en forma de  $\text{NO}_3^-$  (Smil 1999; Smil 2002). La fracción restante del N fijado mediante el proceso Haber-Bosch (25 Tg/año en 2004) y su rol en el ciclo global del N es todavía una incertidumbre debido a que está enfocada a procesos industriales relacionados con la fabricación de plásticos, nilón, explosivos, pegamentos y resinas, muchos de los cuales no están completamente cuantificados (Galloway, Townsend et al. 2008).

Por su parte, la quema de combustibles fósiles es la forma principal, a nivel global, de aporte de N reactivo en forma de óxidos de N (NO<sub>x</sub>) a la atmósfera (Kendall, Elliot et al. 2007). La producción antropogénica de NO<sub>x</sub> puede ser de forma estacionaria (durante la generación de energía y otros procesos industriales) o móvil (a través de los vehículos o cualquier otra forma de transporte convencional) (Kendall, Elliot et al. 2007). Durante este proceso, la formación de NO<sub>x</sub> es doble. En primer lugar, el N acumulado en las reservas geológicas es directamente liberado en forma de Nr y a su vez, las altas temperaturas de los motores de combustión interna fijan indirectamente pequeñas cantidades de N<sub>2</sub> atmosférico y lo convierten en Nr (Vitousek, Aber et al. 1997a). La cantidad de NO<sub>x</sub> emitido mundialmente a través del transporte se ha incrementado de 20 Tg por año en 1997 a 83 Tg por año en 2000 (Vitousek, Aber et al. 1997a; Cofala, Amann et al. 2007).

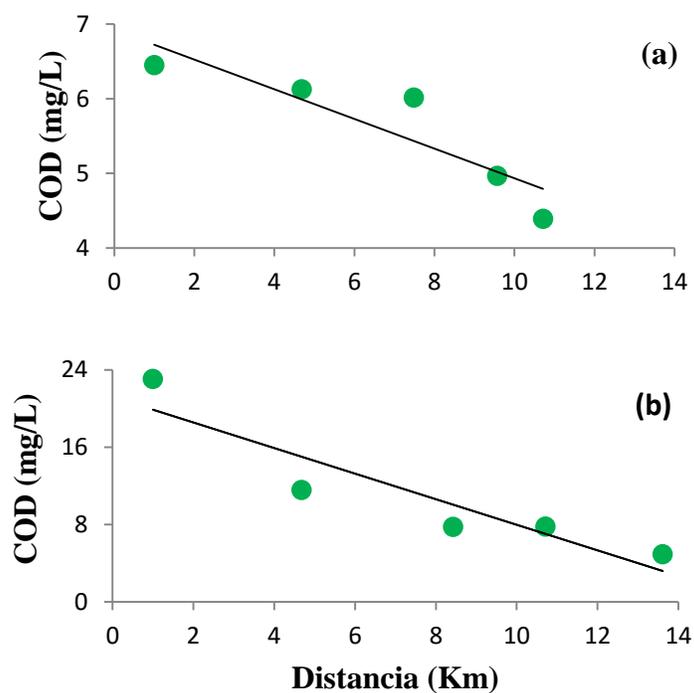
Aunque en menor proporción, el incremento de los cultivos con capacidad de fijación de N (FBN) llega a ser relevante. A pesar de que la mayoría de los cultivos utilizados para la alimentación humana y del ganado carecen de dicha habilidad o sólo llegan a fijar apenas una pequeña cantidad de N (Robertson and Vitousek 2009), los cultivos de leguminosas son, en sistemas agrícolas, los actores principales debido a la asociación simbiótica que tienen con organismos procariotas capaces de fijar N (Herridge, Peoples et al. 2008). El cultivo de la soya es probablemente el más importante debido a que representa el 77 % (16.4 Tg/año) de todo el N fijado por cultivos leguminosos (21.45 Tg/año) (Herridge, Peoples et al. 2008). En comparación, otros cultivos no leguminosos como el arroz, la caña de azúcar y los cereales fijan en conjunto y a nivel global, alrededor de 10 Tg de N por año (Herridge, Peoples et al. 2008). En total, la FBN en sistemas agrícolas se ha incrementado de 42.5 (rango: 32-53) Tg por año en 1995 a 60 (rango: 50-70) Tg por año en 2005 (Galloway, Schlesinger et al. 1995; Herridge, Peoples et al. 2008).

### **A-3. Ingreso del Nr en los cuerpos de agua**

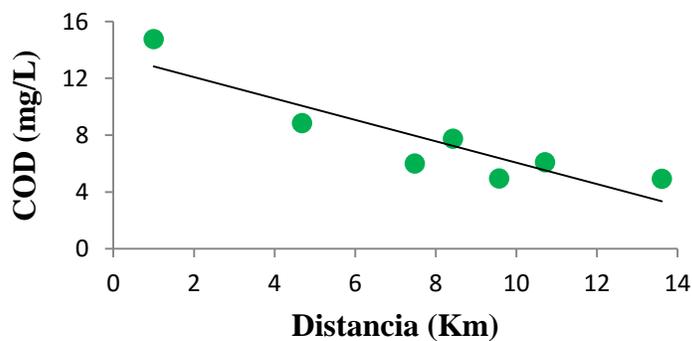
Existen dos vías por las que el Nr alcanza los cuerpos de agua. La primera y más importante es a través del arrastre desde los ecosistemas terrestres (Galloway, Aber et al. 2003). El N movilizado de esta forma está mayoritariamente en forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, aunque también se han observado pérdidas en forma orgánica (DON) (Hedin, Armesto et al. 1995; Perakis and Hedin 2002). A pesar de que los agroecosistemas son la fuente principal de pérdida y arrastre de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Vitousek, Aber et al. 1997a), otros ecosistemas terrestres que presenten saturación de N (generalmente por deposición atmosférica) también muestran abundante lixiviado de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Davidson, Keller et al. 2000). Por su parte, los desechos humanos provenientes de zonas urbanas e industriales pueden llegar a ser considerables emisores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Nolan 2001; van Egmond, Bresser et al. 2002).

La segunda vía es a través de la deposición atmosférica. Debido al corto tiempo de residencia en la atmósfera y al no existir denitrificación aérea, la mayoría de las emisiones emitidas desde la superficie terrestre ( $\text{NO}_x$ ,  $\text{NH}_3$  y  $\text{N}_2\text{O}$ ) son depositadas de vuelta a través de deposición húmeda y seca (Galloway, Aber et al. 2003). Los óxidos de N ( $\text{NO}_x$ ) así como el  $\text{NH}_3$  pueden ser transformados en aerosoles de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  o bien precipitar en forma de  $\text{HNO}_3$  para el caso de los  $\text{NO}_x$  o directamente como  $\text{NH}_4$  para el amoníaco (Galloway, Aber et al. 2003).

## 8.2. Anexo B



**Fig. 1.- Concentración de carbono orgánico disuelto (COD) en función de la distancia al río Katari.** Los datos representan muestras individuales tomadas en Bahía Cohana durante (a) la época húmeda ( $p = 0.04$ ,  $R^2 = 0.803$ ) y (b) la época seca ( $p = 0.026$ ,  $R^2 = 0.848$ ) y (c) anual ( $p = 0.006$ ,  $R^2 = 0.803$ ).



**Fig. 2.- Concentración de carbono orgánico disuelto (COD) en función de la distancia al río Katari.** Los datos representan la media anual de los valores integrados para abril y septiembre ( $p = 0.006$ ,  $R^2 = 0.803$ ).

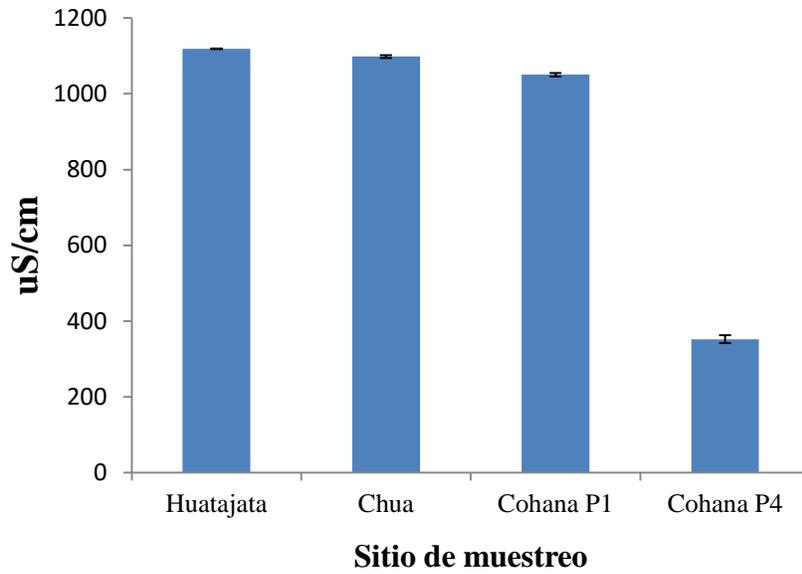
**Tabla 1.-** Valores de carbono orgánico disuelto (**COD**) del agua para cada sitio de muestreo en Bahía Cohana y los sitios de control.

Sitio	Distancia (Km)	Carbono Orgánico Disuelto (COD)	
		Abril	Septiembre
L3	13,61		4,943
P1	10,71	4,39	7,313
P2	9,57	4,97	
P2,5	8,43		7,758
P3	7,48	6,02	
P4	4,68	6,13	11,58
P5	1	6,45	23,08
C1	-	6,51	
C2	-	5,36	7,794

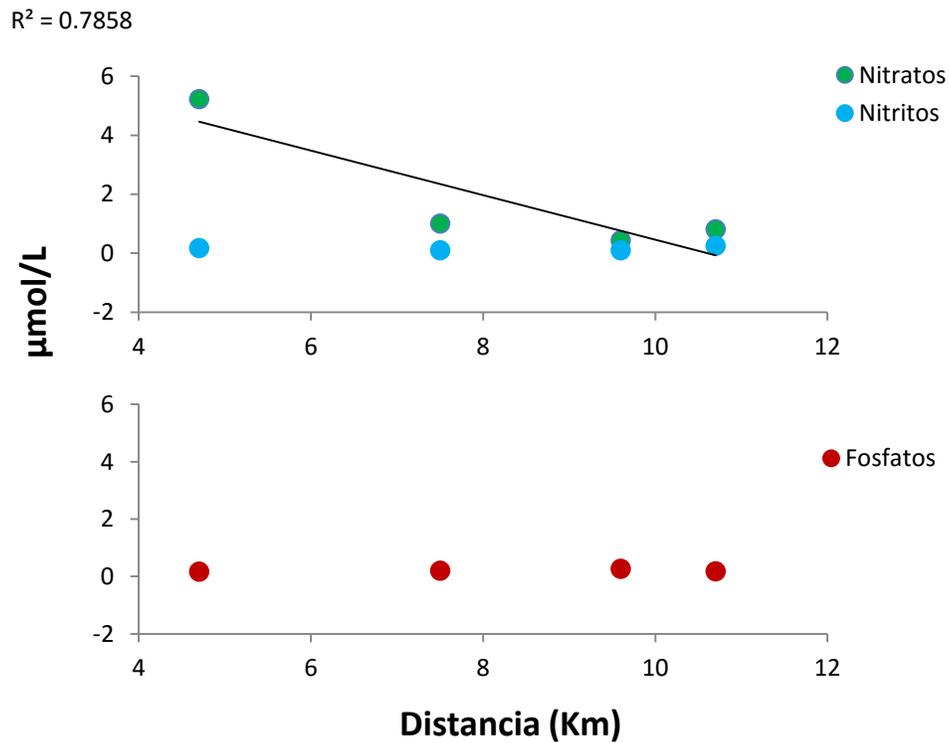
**Tabla 2.-** Datos fisicoquímicos del agua para cada sitio de muestreo en Bahía Cohana y los sitios de control.

	Sitios de muestreo				Controles		P	R <sup>2</sup>
	P1	P2	P3	P4	C1	C2		
°C	16,45	17,47	16,30	12,52	16,47	16,55	0,128	0,759
pH	8,42	8,16	7,16	6,76	7,22	7,48	0,029	0,942
ORP	-148,79	-137,40	-76,16	-454,25	-112,09	-173,65	0,245	0,57
DO (%)	108,53	98,46	54,13	1,90	41,99	70,16	0,004	0,991
DO (mg/l)	6,63	5,85	3,31	0,13	2,56	4,29	0,002	0,995
μS/cm	1050,67	958,62	961,80	405,16	1017,00	952,75	0,091	0,825
TDS (ppm)	525,28	479,08	480,95	202,53	508,58	476,38	0,091	0,825
Salinidad	0,52	0,48	0,48	0,20	0,51	0,47	0,094	0,82

\* Los valores de correlación (R<sup>2</sup>) y significancia (P) son para los sitios desde P1 a P4 y no incluyen a los sitios de control C1 y C2.

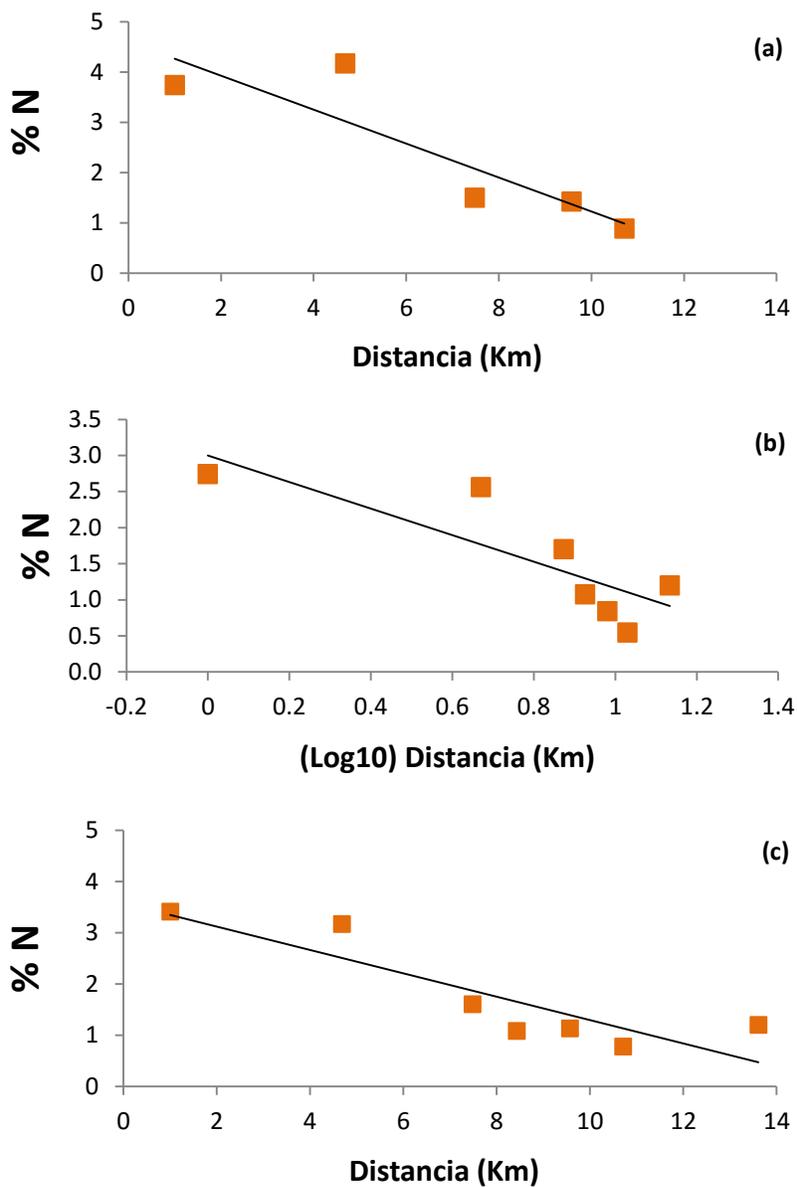


**Fig. 3.- Conductividad en cuatro sitios del lago menor.** Los datos representan valores medidos a 1,5 metros de profundidad en Huatajata, Chua y Bahía Cohana para el mes de abril.



**Fig. 4.- Concentración de nitratos, nitritos y fosfatos en función de la distancia al río Katari.** Los datos representan muestras individuales tomadas en Bahía Cohana durante el mes de abril para (a) nitritos y nitratos y (b) fosfatos. Los valores de regresión para  $\text{NO}_3^-$  son:  $p > 0.05$ ,  $R^2 = 0.785$ .

### 8.3. Anexo C



**Fig. 1.- Contenido de nitrógeno (%) en macrófitas en función de la distancia al río Katari.** Los datos representan valores individuales de la concentración porcentual para los meses de **(a)** abril ( $p = 0.046$ ,  $R^2 = 0.784$ ), **(b)** septiembre ( $p = 0.021$ ,  $R^2 = 0.685$ ) y **(c)** la media integrada para ambas épocas ( $p = 0.009$ ,  $R^2 = 0.771$ ).