



CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, GENÉTICA Y
ÓPTICA DE FLORACIONES TÓXICAS Y NO TÓXICAS
DEL COMPLEJO *Microcystis aeruginosa*

Caracterización morfológica, genética y óptica de
floraciones tóxicas y no tóxicas del Complejo
Microcystis aeruginosa

Msc. Susana Deus Álvarez
Tesis de Doctorado, PEDECIBA
Área Biología,
Sub- Área Microbiología
2015

Tutora: Dra. Claudia Piccini
Departamento de Microbiología (IIBCE)

Co-Tutora: Dra. Carla Kruk
Ecología Funcional de Sistemas Acuáticos (CURE-Rocha)
Sección Limnología, (Facultad de Ciencias)

Co-Tutor: Dr. Martín Montes
Université du Québec à Rimouski
Institute des Sciences de la Mer

Tribunal: Dra. Beatriz Brena
Dra. Haydée Pizarro
Dra. Beatriz Yanicelli

*Este trabajo fue financiado por ANII-Beca
Posgrado Nacional 2014_1_10277*



Agradecimientos

Lo primero agradecer a mis dos tutoras, Claudia y Carla por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo junto a ellas. Por un lado a Claudia por haberme recibido con las puertas abiertas en el IIBCE y haber sido una gran compañera en esto que algunos llaman viaje. Gracias por retarme cuando era necesario y gracias por hacernos sentir que siempre podemos contar contigo. Ha sido un inmenso placer compartir estos tres años contigo y sabes que la seguimos a distancia, porque esto no se queda aquí. También gracias a Carla por recibirnos siempre en Rocha, por ser nuestra mente pensante frente a la estadística y por hacernos mil preguntas para hacernos pensar y replantearnos las cosas una y mil veces. Gracias a ambas, sabéis que tenéis una casa en Madrid. Además, agradecer a mi co-tutor Martín por recibirme en Canadá y por los consejos aportados en la parte de óptica.

Lo segundo mil gracias a mis dos compañeros de viaje, Gaby y Nacho, por ser tan sumamente geniales y convertir esto en una gran amistad. A Gaby gracias por acompañarme en los muestreos, por las horas compartidas en el lab, por las supervisiones con los qPCR, por los viajes a Rocha, por los carnavales compartidos, las fiestas, las risas y de vez en cuando las lágrimas ya que de compañera de trabajo te convertiste en una gran amiga. Intentaré volver para tu defensa, y lo sabes, aunque siempre diré que hubiera sido perfecto hacer una defensa en conjunto. A mi querido Nachete porque eres un crá, porque no hubiera sobrevivido esta tesis sin nuestros audios de whatsapp. Gracias por arruinarme la vida cuando se te ocurrió que estaría genial que cambiáramos del ggplot al ggpubr 😊, por siempre darme una mano con el R y sobre todo gracias por nuestras caminatas al volver de natación porque no podía con mi vida para volver en bici 😊. Mil gracias a los dos, nos vemos en Madrid!!

Ahora un gran GRACIAS a todos mis compañeros del lab, a los que siguen y a los que se fueron. Gracias a todos y cada uno por siempre estar ahí para dar una mano, por acompañarme en mis locuras, por las charlas intentando salvar el mundo (eso va por ti Gonza😊) por las buenas sobremesas, por las fiestas en Monte (Flor, mi eterna compañera de risas y fiestas) y en Maldo (mi queridísima Belén), por los viajes, por los amigos invisibles, por las risas y por mil cosas más, pero sobre todo gracias por hacerme sentir una más y que a pesar de lo mucho que hablo me hacéis sentir que me vais a echar de menos. Gracias a mis compañeras de oficina (Pao, Vicky, Ana y Majo) por dejarme abrir la ventana y que entrara luz, sé que lo hacéis porque me queréis 😊 y sobre todo, sobre todo a mi queridísima Dani, por el tiempo perdido ayudándome con el Word, por los mil consejos y por estar siempre ahí para contestar mi WhatsApp de auxilio. Lo dicho, gracias a todo el lab y también gracias a todos los compañeros del área por siempre prestar una mano. A algunos os veo en Madrid muy prontito con lo cual no me voy tan triste.

Gracias a la CTM (Facundo, Ernestina y Pedro) por ayudarnos con los muestreos y siempre estar dispuestos a llevarnos con el barco a donde necesitábamos. Fueron nueve grandes muestreos donde me reí mucho y disfrute del trabajo de campo.

Gracias a mis amigos de Montevideo a todos y cada uno de ellos que siempre han estado ahí. Gracias por las cenas, las playas, las fiestas, los mates, los viajes y las miles de risas compartidas. Sobre todo gracias a mis amigos que se convirtieron en familia (Estela, Gloria, Andrea, Javi, Vero, Álvaro y Anahí). Gracias a las chicas de los miércoles, especialmente a Vanesa por ser compañera de trabajo y amiga. Gracias a todos los de la familia uruguaya y sobre todo gracias a mi familia adoptiva (Stella, Hugo y Felipe) por todos esos almuerzos de domingo, día de la madre, día del padre, cumpleaños, navidades y mil momentos más. Gracias a mis compañeros de piso que me aguantaron todos estos años, especialmente a mi querido Pierluigi y a mi querida Virginia porque su energía fue vital y a Flor que me ayudo mil veces con el diseño gráfico de la tesis y por todas nuestras charlas sobre la vida. Muchas gracias a Borja que se leyó la tesis por lo menos 10 veces para ayudarme en la escritura y que sin tener ni idea del tema y viniendo de la pura ingeniería me dijo muy orgulloso “pues he entendido lo que has hecho” 😊.

Gracias a todos los del CURE de Maldonado por recibirme tan bien y por hacer de dar clases uno de los mejores trabajos que tuve. Gracias a las lady's (Marianita y Lucía) porque fueron mi pilar de apoyo más importante en estos último 5 años. Gracias a mis compañeros y a los estudiantes por esos 3 maravillosos años. Gracias a Sole por las charlas, los viernes y los grupos de trabajo en conjunto; a Damián por ser tan increíblemente genial conmigo, por hacerme sentir siempre como una invitada de honor en Ocean, por las grandes conversaciones filosóficas y por estar ahí siempre apoyándome; por supuesto a Cacu por salvarme el puesto y a Mariana por todas las comidas en la floresta, todos los Skype y por hacer de taller I un sitio ideal para trabajar.

Finalmente gracias a mis amigos de Madrid por estar ahí siempre para hacer Skype, por estar esperándome con los brazos abiertos cada vez que fui de visita y por hacerme sentir que aunque haga ya 11 años que me fui sigo siendo parte de sus vidas. Y por último muchas, muchas, muchas e infinitamente muchas gracias a mi familia, a mis padres y a mi hermano, que han estado apoyándome a 10.000 km de distancia y que sé que les hubiera encantado estar aquí. Os quiero con locura y vuelvo a casa hecha una doctora.

Por último, y no menos, gracias a PEDECIBA, la ANII y CSIC por la financiación recibida que sin ella no hubiera sido posible realizar este doctorado.

« La perfection est atteinte non pas lorsqu'il n'y a plus rien à ajouter, mais lorsqu'il n'y a plus rien à retirer »

« La perfección no se alcanza cuando no queda nada que añadir, sino más bien cuando no queda nada que quitar »

« C'est le temps que tu as perdu pour ta rose qui rend ta rose importante »

« Es el tiempo que uno pasa ocupándose de una rosa que le da importancia a esa rosa »

Antoine de Saint-Exupéry

Índice

Resumen	10
Abstract	11
Capítulo 1. Introducción general	13
1.1. Problemática ambiental y floraciones de cianobacterias	13
1.1.1 Complejo <i>Microcystis aeruginosa</i> : definición.....	16
1.1.2. Ecología funcional del CMA.....	17
1.1.3. Toxicidad del CMA.....	19
1.1.4 Estructura y síntesis de toxinas	20
1.1.5. Efectos de las toxinas	21
1.1.6. Regulación de la producción de toxinas.....	22
1.1.7. Morfología y producción de toxinas.....	24
1.2. Propiedades ópticas en los cuerpos de agua	25
1.2.1. Propiedades ópticas del agua.....	25
1.2.2. Propiedades ópticas del fitoplancton.....	27
1.2.3. Sensoramiento remoto basado en propiedades ópticas	27
1.3. Hipótesis	31
1.4. Objetivo	31
Capítulo 2: Potencial tóxico y morfología de organismos del CMA.....	34
Capítulo 2.1. Potencial tóxico y morfología de organismos del CMA en un gradiente ambiental desde el Río Uruguay al Río de la Plata.....	34
2.1.1. Antecedentes.....	34
2.1.2. Materiales y métodos.....	34
Área de estudio y muestreo	34
Identificación, conteo y biovolumen de fitoplancton	36
Determinación de la abundancia de genotipos tóxicos	36
Análisis de datos.....	37
2.1.3. Resultados	38
Caracterización ambiental.....	38
Tamaño y toxicidad del CMA en el gradiente ambiental estudiado	39
2.1.4. Discusión.....	40
Capítulo 2.2. : Potencial tóxico y morfología de organismos del CMA en el embalse de Salto Grande.....	41
2.2.1. Introducción	41
2.2.2. Materiales y métodos.....	42

Área de estudio	42
Muestras.....	44
Conteo y cálculo del biovolumen de fitoplancton.....	46
Extracción de ADN	48
Cuantificación de genotipos tóxicos del CMA	48
Análisis genéticos y de la concentración de microcistinas	49
Análisis de los datos	50
2.2.3. Resultados	52
Caracterización ambiental.....	52
Estudio de la morfología en las comunidades del CMA	56
Potencial tóxico de las muestras	64
Potencial tóxico en relación al tamaño de los organismos del CMA.....	65
Evaluación de la toxicidad del CMA mediante cuantificación del ARNm de <i>mcyE</i>	70
Evaluación de la toxicidad mediante la concentración de microcistinas	72
Diversidad del gen <i>mcyJ</i> en las comunidades del CMA.....	74
2.2.4. Discusión.....	76
Capítulo 3: Tamaño, potencial tóxico y propiedades ópticas de comunidades naturales con presencia de CMA	82
3.1. Introducción	82
3.2. Materiales y métodos.....	82
Muestras.....	82
Medidas ópticas.....	83
Test preliminar con la aplicación Hydrocolor	83
Cálculos del índice g440	85
Razones ópticas	85
Análisis de datos.....	86
3.3. Resultados	88
Caracterización de la aplicación <<Hydrocolor>>	88
Calibración del sistema.....	90
Hydrocolor como herramienta de detección del CMA	93
Relaciones entre indicadores biológicos e indicadores ópticos de los organismos del CMA	94
Generación de modelos estadísticos.....	95
3.4. Discusión.....	100
Capítulo 4.....	103
4.1. Consideraciones finales	103
4.3. Perspectivas.....	105

Referencias bibliográficas	106
Anexo I. Material adicional	113
Anexo II: Actividades realizadas durante el doctorado (Abril 2015-Abril 2018).....	116

Resumen

Las floraciones nocivas de fitoplancton son un serio problema ambiental de amplia distribución mundial. Entre las floraciones más frecuentes en Uruguay se encuentran las que forman las especies del grupo *Microcystis aeruginosa* (CMA). El CMA produce microcistinas, un tipo de cianotoxinas que en los humanos producen daño en el hígado. Algunos estudios afirman que existe una relación entre el tamaño de las colonias y su toxicidad, y que aquellas cuyo tamaño es mayor a 100 μm serían las más tóxicas. Además, las especies del CMA tienden a acumularse en las capas superficiales, por lo que son floraciones de fácil detección con sensores ópticos. El presente trabajo emplea una aproximación novedosa que conjuga tres características del CMA: morfología, toxicidad y propiedades ópticas, para generar un modelo de detección de organismos tóxicos en cuerpos de agua. La tesis se desarrolló con muestras provenientes del embalse de Salto Grande y se realizaron análisis de microscopía, qPCR y captura de fotografías mediante una aplicación de móvil <<Hydrocolor>> ajustada para obtener los valores de reflectancia de la luz en el agua (Rrs). Los resultados mostraron una relación entre el tamaño y la toxicidad de las muestras, observándose una diferencia en la abundancia de genotipos tóxicos, en su expresión génica y en la producción de microcistinas según el tamaño de los organismos del CMA. Al analizarse la diversidad genética de las poblaciones tóxicas se detectaron dos grupos de genotipos caracterizados por presentar distinto tamaño, con un punto de corte en 94.5 μm de máxima dimensión lineal. Así, organismos tóxicos del CMA menores a 94.5 μm pertenecerían a un genotipo, mientras que los mayores serían un genotipo diferente. Estas diferencias de composición genotípica entre organismos de diferente tamaño serían especialmente notorias durante los periodos de floración (diciembre-marzo) y sugiere la existencia de cambios a nivel intra-específico en la comunidad, probablemente asociados a cambios ambientales (temperatura, nutrientes, etc.). En relación a la caracterización óptica, se observaron correlaciones significativas y negativas entre el biovolumen y la abundancia de genotipos tóxicos con los cocientes Rrs rojo/verde y Rrs azul/verde. Por tanto, valores bajos del cociente Rrs (más presencia del color verde) correspondieron a muestras con mayor biovolumen de organismos tóxicos del CMA. Mediante la aplicación de técnicas de clasificación se logró un modelo estadístico que permite predecir la abundancia de organismos tóxicos del CMA empleando al cociente Rrs rojo/verde como la única variable explicativa. En suma, en esta tesis se encontró que las colonias del CMA cuya dimensión lineal máxima oscila entre 60 y 150 μm serían las más tóxicas, existiendo diferentes genotipos según el tamaño de la colonia. Asimismo, la presencia y abundancia de estos organismos y

los genes que codifican para la síntesis de microcistinas se pueden predecir mediante la toma de fotografías digitales con la aplicación Hydrocolor. Estos resultados constituyen el primer paso para el uso del sensoramiento remoto basado en el valor de la reflectancia del agua (R_{rs} rojo/verde) y en el tamaño de las colonias del CMA como bio-indicadores de la calidad del agua.

Abstract

Harmful Algal Blooms (HABs) are globally distributed and represent a serious threat for human health and aquatic ecosystems due mainly to the production of biotoxins and negative effects on water quality and biodiversity. One of the most concerning HABs in freshwater environments is the *Microcystis aeruginosa complex* or MAC (i.e., a group of *Microcystis* 'morpho-species'). MAC can produce the potent hepatotoxin microcystin (MC), and thus persistent blooms pose a risk to those who use impaired water resources for drinking water supplies, recreational activities, and fisheries. Previous studies indicated that MC production from MAC population is related to its colony size and it is suggested that colonies larger than 100 μm are the most toxic. MAC colonies forms superficial blooms, so surface water samples (i.e., 0-1 m) containing MAC organisms have different optical signatures with respect to those dominated by other phytoplankton groups or where MAC is absent. Therefore, it is suggested that toxicity of MAC colonies is related to their size distribution and remote sensing reflectance (R_{rs}) spectra as derived from smartphone measurements. The objective of this project was to develop algorithms for detecting MAC organisms and estimating their toxicity in a freshwater reservoir of Uruguay. The abundance and maximum linear dimension of MAC organisms was determined using optical microscopy (inverted microscopy). R_{rs} was computed based on RGB bands and three radiance optical components (upwelling, sky and reference). Three R_{rs} ratios were computed for estimating chlorophyll-a concentration and biovolume, and chromophoric dissolved organic matter (CDOM) (ratio1=red/green and ratio2=blue/green, and ratio3=red/blue, respectively). MAC toxicity was quantified based on 3 genetic proxies: abundance of a gene involved in microcystin synthesis (*mcyE*), microcystin concentration (MC) and diversity of toxic genotypes based on *mcyJ* gene variability. We found that all the indicators (Bv, Cl-a, MC; *mcyE* and *mcyJ*) were associated to maximum linear dimension (MLD) as a value of morphological trait at individual and community levels. There was a strong positive relationship between colony size and different indicators of toxicity where medium colonies (60-150 μm) showed a higher *mcyE* abundance and total microcystin concentration. Moreover, our results suggested that there are differences in *mcyJ* genotype

composition among organisms with different sizes, which appeared to be rather stable over the blooming period suggesting intraspecific changes inside the community probably associated with environmental changes (temperature, nutrients, etc.). On the other hand, our results showed a negative correlation between ratio R_{rs} red/green and the biological and toxicity indicator (biovolume, chlorophyll and *mcyE* copies). The ratio R_{rs} red/green turned to be the most useful optical parameter for estimating MAC toxicity based on CART predictions. In conclusion our results are the first step on proposing a statistical method for water quality assessment base on remote sensing with digital photography.

Capítulo 1. Introducción general

1.1. Problemática ambiental y floraciones de cianobacterias

La pérdida de calidad del agua y el desarrollo de floraciones nocivas de fitoplancton son problemáticas actuales en Uruguay y en el mundo (Huisman et al., 2005; Paerl y Huisman, 2008; Vidal y Kruk, 2008; Vidal y Britos, 2012, Bonilla et al., 2015). Las floraciones son el crecimiento excesivo de una o pocas especies de fitoplancton en un cuerpo de agua (Smayda, 1997; Chorus y Bartram, 1999) y en los ecosistemas de agua dulce y costero-estuarinos son causadas principalmente por cianobacterias (Perez, Bonilla, De Leon, Smarda y Komarek, 1999; De Leon y Yunes, 2001; Aubriot et al., 2005; Brena, 2009; Chorus, 2012). Las floraciones disminuyen la transparencia y la concentración de oxígeno, generan olor y sabor desagradables y merman la biodiversidad (Huisman, Matthijs y Visser, 2005; Bonilla, 2009; Chorus, 2012). Las floraciones de cianobacterias productoras de cianotoxinas representan la situación más adversa, ya que afectan a quienes consumen el agua (animales y humanos), pueden contaminar cultivos a través del riego y las toxinas pueden bio-acumularse en los tejidos (Chorus y Bartram, 1999). Esto genera inconvenientes sanitarios y sociales, así como importantes pérdidas económicas (DINAMA, 2009; OSE, 2009; Chorus, 2012; informe facultad de ciencias, 2013; Vidal et al., 2017).

El aumento de actividades agropecuarias con uso intensivo de fertilizantes y herbicidas y el vertido de desechos a los cuerpos de agua ocasionan la eutrofización de los ecosistemas acuáticos. La eutrofización resulta del aumento de la concentración de nutrientes (nitrógeno, fósforo) en el agua y es una de las principales causas del aumento de la frecuencia e intensidad de las floraciones algales (Mazzeo et al., 2002; Aubriot, Conde, Bonilla, Hein y Brito, 2005; Chalar, 2009; Rodríguez-Gallego, 2010; Kruk, Suárez, Ríos y Zaldúa, 2013) ya que son usados como nutrientes (Paerl, 2014). Las cianobacterias son extremadamente efectivas en secuestrar fuentes de fósforo, incluso en bajas concentraciones, (Saxton, Arnold, Bourbonniere, McKay y Wilhelm, 2012) y puede acumularlo intracelularmente lo que le permite sobrevivir en periodos de bajos recursos (Carr y Whitton, 1982). Además, su habilidad de migrar verticalmente también optimiza el acceso al fósforo biológico disponible. Tradicionalmente, la reducción en el aporte de fósforo ha sido el centro de las medidas para el control de las floraciones de cianobacterias, pero en los últimos años, los estudios han demostrado que el nitrógeno antropogénico también juega un papel fundamental en la proliferación

de estos organismos (Paerl et al., 2011). Hay cianobacterias que no son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, por lo que los aportes de nitrógeno generados por la actividad humana (agricultura, industria, aguas domésticas, etc.) son el factor que explican el crecimiento y la proliferación de estas especies (Harke et al., 2016). Otras causas del aumento de las floraciones son las modificaciones físicas de los cuerpos de agua, como el represamiento, la canalización y la destrucción de la vegetación ribereña (Conde, Arocena y Rodríguez-Gallego, 2002; Kruk et al., 2006) (Fig. 1).

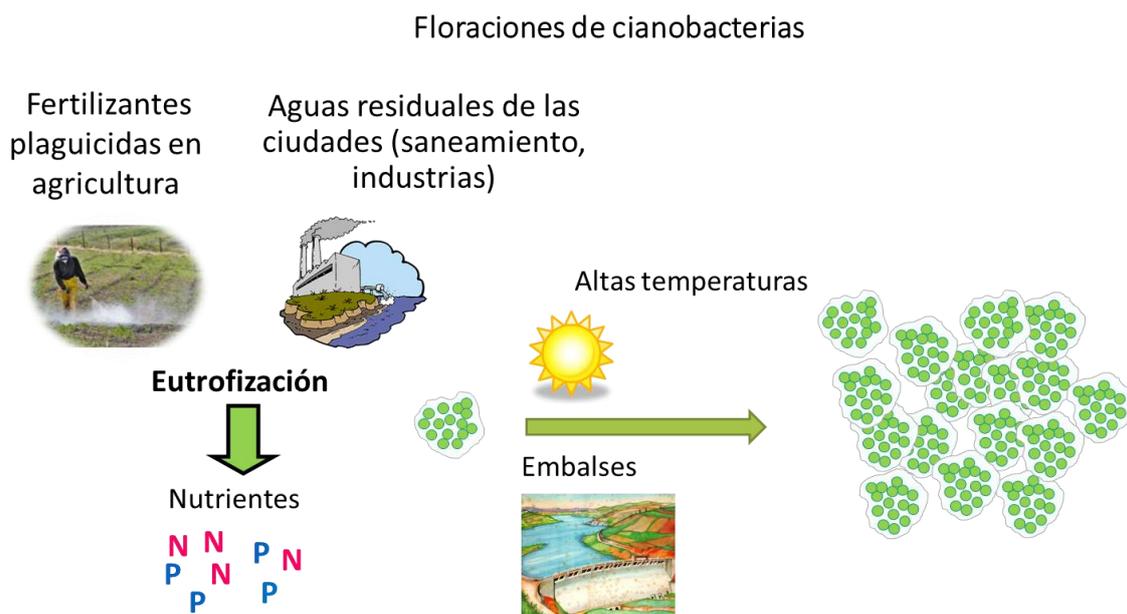


Fig. 1. Diagrama conceptual que ilustra las variables que controlan la formación de cianobacterias y su proliferación en los ecosistemas acuáticos (Diagrama creado para esta tesis).

En Uruguay existe una tendencia de deterioro de la calidad de los cuerpos de agua (Tabla 1; Kruk et al., 2013). Como consecuencia principal, la frecuencia de proliferaciones algales masivas ha aumentado, incluido las cianobacterias potencialmente tóxicas como *Microcystis aeruginosa* y *Cylindrospermopsis raciborskii* (Kruk y De León, 2002; Vidal y Kruk, 2008; Bonilla et al., 2015).

Tabla 1. Revisión de datos publicados (periodo 2007-2011) con un total de 151 casos organizados por tipo de ecosistema. Entre paréntesis se incluye el número de casos. La categorización del estado de cada ecosistema consideró la concentración de fósforo total (μgL^{-1}) y la de clorofila-a (μgL^{-1}) en el agua en base a la clasificación de estado trófico según Salas y Martino (1990). *Bajas biomásas de fitoplancton muchas veces asociadas a material inorgánico en suspensión generado por arrastre de la zona litoral modificad. Tomado de Kruk et al. (2013).

	Clasificados como eutróficos	Altas biomásas y/o floraciones nocivas de fitoplancton
En conjunto (151)	70%	40%
Embalses (15)	60%	30%
Lagos artificiales (19)	70%	100%
Lagos naturales (48)	54%	20%
Lagos naturales modificados (5)	100%	0*
Lagunas costeras (15)	53%	50%
Ríos (49)	94%	Sin información

En una compilación realizada por Bonilla (2009) y posteriormente en un estudio de Bonilla et al. (2015) se remarcó la problemática de las floraciones de cianobacterias en Uruguay. En ese estudio se generó una base de datos históricos y se construyeron mapas georreferenciados para visualizar la distribución de cianobacterias en el Uruguay. En estos mapas se destacaron los embalses de Rio Uruguay y de Rio Negro y las playas del Rio de la Plata como las zonas de mayor riesgo de exposición a cianobacterias, de acuerdo a las categorías de la Organización Mundial de la Salud para aguas recreacionales (Fig. 2).

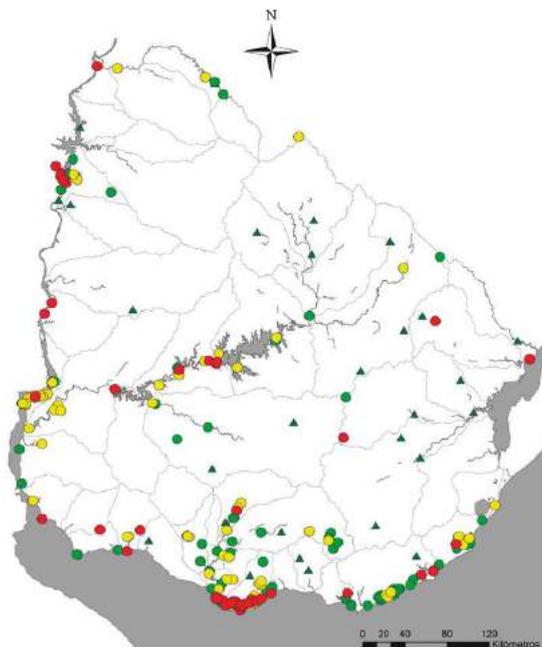


Fig. 2. Mapa de Uruguay con los sitios georreferenciados donde se han detectado cianobacterias (1980-2014), categorizados según los niveles guía de la OMS para aguas recreacionales. Círculos amarillos = riesgo bajo, círculos verdes = riesgo moderado, círculos rojos = riesgo alto (por encima del nivel Guía 2 de las OMS ($>100.000 \text{ cel/ml}$), triángulos verde oscuro = sin eventos de cianobacterias (2008 – 2012, datos cualitativos OSE). Tomado de Bonilla et al. (2015).

1.1.1 Complejo *Microcystis aeruginosa*: definición

Como resultado de la eutrofización y modificaciones físicas de los ambientes una de las cianobacterias formadoras de floraciones más frecuentes son las del género *Microcystis*. Estas se caracterizan morfológicamente por formar colonias de células esféricas u ovaladas con diámetros de entre 3 y 5 micras (Komárek y Komárkova, 2002). En condiciones naturales se encuentran en forma colonial con células individuales de manera dispersa. Estas colonias pueden tener cientos o miles de células inmersas en un mucílago y alcanzar tamaños de pocos milímetros que las hacen visibles a simple vista (Fig. 3). En condiciones de alta carga de nutrientes y temperaturas mayores a 15°C, pueden acumular grandes biomásas y formar floraciones superficiales, generando manchas verdes notorias para los usuarios (Reynolds, Jaworski, Cmiech y Leedale, 1981; Paerl et al., 2011) (Fig. 3).

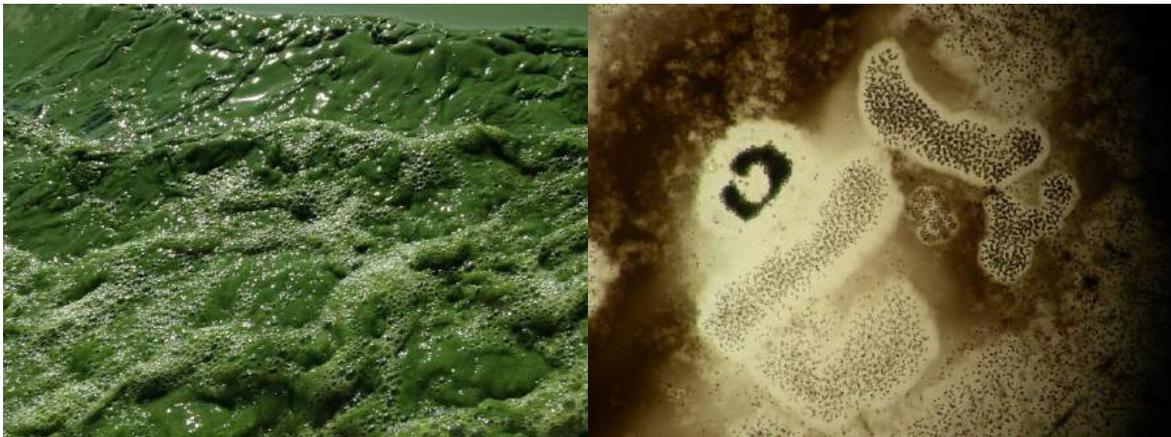


Fig. 3. Izq: Foto de una floración masiva en el embalse de Salto Grande (Foto de Susana Deus, 2015). Dcha: Imagen al microscopio de la diversidad morfológica de las colonias (Foto de Carla Kruk de muestras de Salto Grande)

Dentro del género *Microcystis* existen varias especies. Las más comunes incluyen: *M. aeruginosa*, *M. botrys*, *M. firma*, *M. flos-aquae*, *M. ichthyoblabe*, *M. natans*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. smithii*, *M. viridis* y *M. wesenbergii* (Fig. 3; Komárek y Komárkova, 2002). La utilización de la denominación de especie como unidad de estudio puede presentar algunas dificultades, ya que por ejemplo una misma especie puede exhibir múltiples características morfológicas como respuesta a determinados estímulos ambientales o fisiológicos (Yang, Kong, Shi y Cao, 2006). Diferentes especies de este género tienen similares tolerancias y sensibilidades a las condiciones ambientales, por lo que sus respuestas a los cambios ambientales y sus efectos pueden ser similares (Kruk et al., 2010). Asimismo, estas especies poseen similitudes en marcadores filogenéticos que permite su agrupamiento en lo que se llama el complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) (Watanabe, Harada, Carmichael, & Fujiki, 1995; Otsuka et al., 1999, 2001; Vidal, 2002). La agrupación de estas especies en un complejo facilita el

análisis con objetivos de investigación y de gestión. Por ejemplo, simplifica la tarea de identificación microscópica y enumeración con objetivos para la salud pública, aportando a la generación de alertas y a la prevención de intoxicaciones de los usuarios ya que facilita la rápida detección de una especie como parte del complejo (Harke et al., 2016).

La importancia de estudiar este complejo radica en que las especies del CMA son las floraciones más frecuentes en Uruguay y en el mundo. Los organismos del CMA son bacterias cosmopolitas y sus floraciones se han reportado en todos los continentes excepto en la Antártida (Zurawell, Chen y Burke, 2005). En los últimos años ha aumentado la frecuencia de floraciones a nivel mundial. Harke et al. (2016) relevaron datos en 257 países y territorios para plasmar la distribución geográfica del CMA. De este relevamiento se obtuvieron informes de floraciones en 108 países y confirmaciones de microcistinas asociadas a las floraciones en 70 de ellos (Fig. 4).

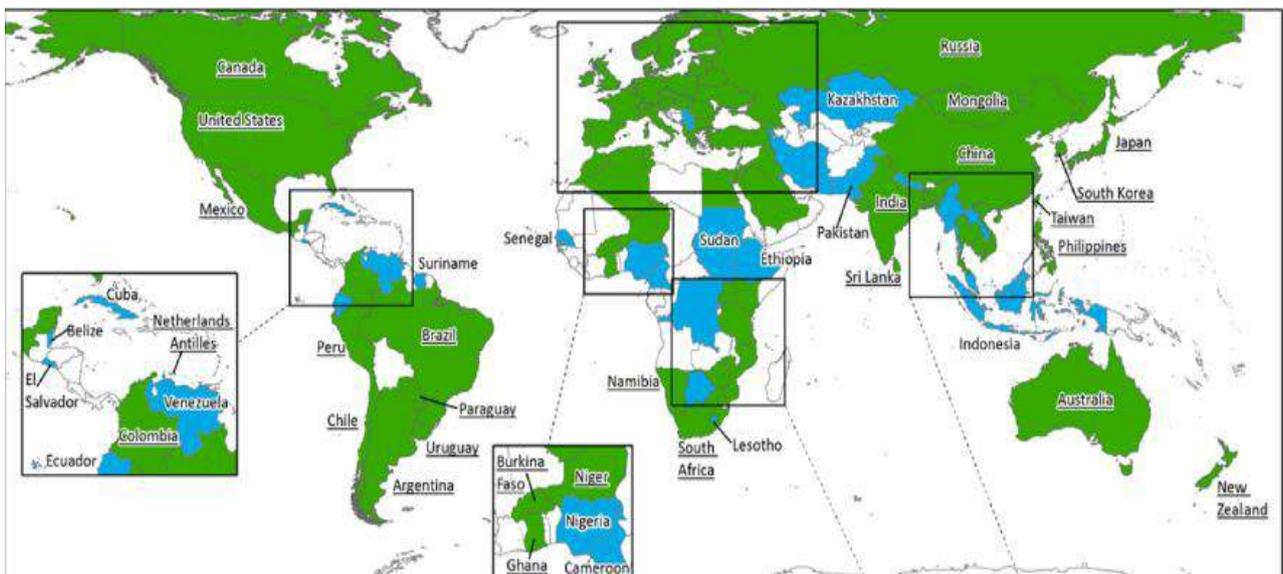


Fig. 4. Estudio de la aparición de floraciones de *Microcystis* y microcistinas en la literatura de 257 países y territorios. El color blanco indica que no se encontró literatura al respecto, el azul indica que se encontró literatura sobre la aparición de floraciones y el verde indica países o territorios donde hay datos de floraciones y microcistinas (Harke et al., 2016).

1.1.2. Ecología funcional del CMA

Los rasgos morfológicos resumen muy bien aspectos funcionales de los organismos del fitoplancton, sus respuestas a los cambios ambientales y sus efectos en el ambiente (Reynolds, 2006; Kruk et al., 2010; Kruk et al, 2017). Por ejemplo el uso de rasgos morfológicos (e.g. volumen, presencia o no de mucílago) permite agrupar a los organismos del fitoplancton en grupos funcionales basados en morfología (GFBM; Fig. 5) con diferentes rasgos fisiológicos y ecológicos y respuestas a los cambios

ambientales (Kruk et al 2010; Kruk et al 2011; Kruk & Segura, 2012). En particular las formas coloniales de los organismos del CMA están bien representados en el GFBM VII mientras que las células individuales se incluyen en el GFBM III (Fig. 5).

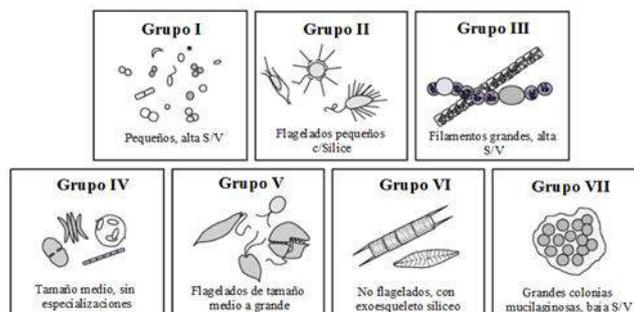


Fig. 5: Representación esquemática de los siete grupos funcionales incluyendo una breve descripción de su morfología, S superficie y V volumen. Tomado de Kruk & Segura (2012).

Los integrantes del grupo VII tienen gran tamaño y baja relación superficie/volumen, bajas tasas de crecimiento y son favorecidos en ambientes con alta carga de nutrientes y en situaciones de estratificación térmica. La presencia de mucílago y aerótopos (grupos de vacuolas de gas) les permite controlar la flotación y recuperarse rápidamente luego de eventos de mezcla (Kruk et al., 2017). Debido a estas características las floraciones de CMA son favorecidas (dominantes) en ambientes mesotróficos y eutróficos, en estos últimos alcanzan grandes biomásas que se acumulan en la superficie formando manchas verdes fácilmente reconocibles (Reynolds et al., 1981).

Las acumulaciones superficiales de CMA pueden dominar el ecosistema y limitar el desarrollo de otras especies de fitoplancton (Oliver y Ganf, 2000). Además de afectar a la biodiversidad, inclusive al zooplancton (Reynolds, 2006) y organismos de niveles tróficos superiores (Bonilla, 2009).

Las variables ambientales y factores físicos como la luz, la temperatura, la salinidad, la mezcla vertical, el flujo hidrológico, el aumento de las temperaturas y las descargas de las aguas dulces influyen en el desarrollo y en la dinámica de las floraciones del CMA (Paerl, 2014; Kruk et al., 2017; Fig. 6). La biomasa, diversidad y toxicidad son mayores en condiciones de mayor temperatura y nula salinidad, donde además forman floraciones (Kruk et al., 2017; Fig. 6). La salinidad y las bajas temperaturas limitan su biomasa y tasa de crecimiento pero no su ocurrencia en los ecosistemas (Fig. 6).

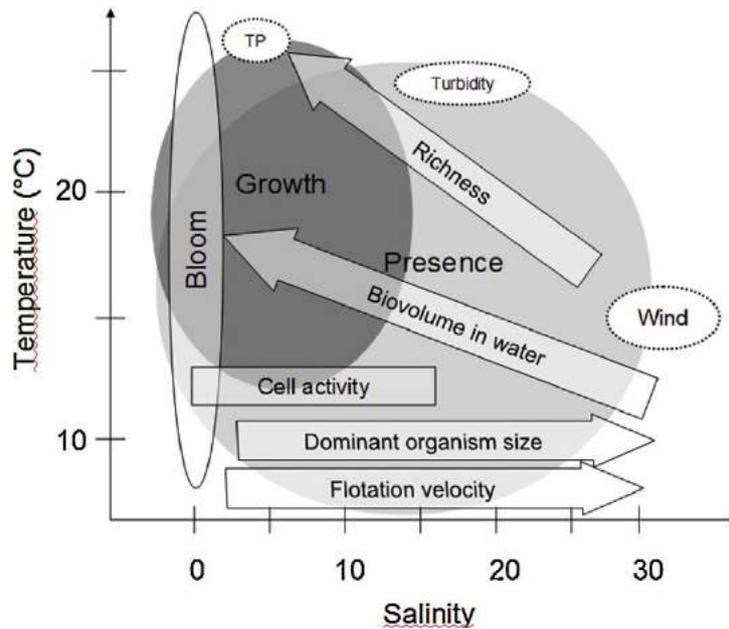


Fig. 6. Resumen de los efectos de las dos principales variables (alinidad y temperatura) que afectan los distintos rasgos del CMA. Se incluyen además otras variables ambientales de menor relevancia: turbidez, fósforo total (TP) e intensidad del viento (wind). Las flechas indican la dirección del incremento. Tomada de Kruk et al. 2017.

1.1.3. Toxicidad del CMA

Varias especies de cianobacterias producen compuestos naturales que son tóxicos para otros organismos (cianotoxinas), incluyendo a los mamíferos. Las cianotoxinas pueden afectar a diversos órganos, en base a ello se denominan hepatotoxinas, neurotoxinas o dermatotoxinas. El CMA es conocido por su habilidad para producir microcistinas, que son hepatotoxinas (Bishop, Anet, y Gorham, 1959).

Existen diferentes incógnitas acerca del origen y evolución de los genes responsables de la síntesis de microcistinas. Algunas teorías han sugerido que el papel de la toxina sería el de señal celular, regulación de la luz o transporte de iones; mientras que otras la proponen un papel ecológico (ej. anti-herbivorismo o alelopático). La teoría ecológica se contradice por Raantala et al. (2004) que establecieron que los genes ancestrales se originaron en las cianobacterias hace aproximadamente 2000 millones de años previo a la aparición de los eucariotas la cual se estima que comenzó hace unos 1500 millones de años. Esto indicaría que el objetivo de la producción de las microcistinas, al menos en su versión ancestral, no hubiera sido el de ser un compuesto tóxico para las eucariotas. Algunos autores consideran a las microcistinas como metabolitos secundarios, es decir compuestos

producidos por los organismos que no se usan en el metabolismo primario como el crecimiento o división celular, por lo que se asume que no tengan funciones endo o exógenas particulares (Carmichael, 1992; Kleinkauf y von Döhren, 1996). Aun así, el verdadero rol de las microcistinas sigue siendo esquivo (DeMott, Zhang y Carmichael, 1991; Lukac y Aegerter, 1993; Arment y Carmichael, 1996).

Las comunidades de CMA se componen de individuos que contienen los genes que sintetizan la toxina (genotipos tóxicos) y otros que no (genotipos no tóxicos) por lo que la abundancia total de CMA no es un buen indicador de toxicidad. La potencialidad total de producción de microcistinas en una floración se podría determinar estimando la abundancia de células productoras de microcistinas (Hotto, Satchwell, Berry, Gobler y Boyer, 2008). Esto hace necesario el desarrollo de metodologías que permitan detectar genotipos tóxicos (Martinez de la Escalera et al., 2014, 2017).

1.1.4 Estructura y síntesis de toxinas

Las microcistinas son un grupo diverso de cianotoxinas. Son heptapéptidos cíclicos y se conocen unos 200 congéneres que intercambian los aminoácidos en las posiciones X y Z que dificulta la detección. La Organización Mundial de la Salud (WHO) propuso un valor guía de 1µg/l en agua potable para la variante más común microcistina-LR y de 20 µg/l en aguas recreacionales (WHO, 2003). Esta molécula es sintetizada de manera no ribosomal mediante la combinación de un complejo péptido sintasa - policétido sintetasa (Adda) que se transcriben bi-direccionalmente desde una región interna promotora (Tillett et al., 2000; Fig. 7).

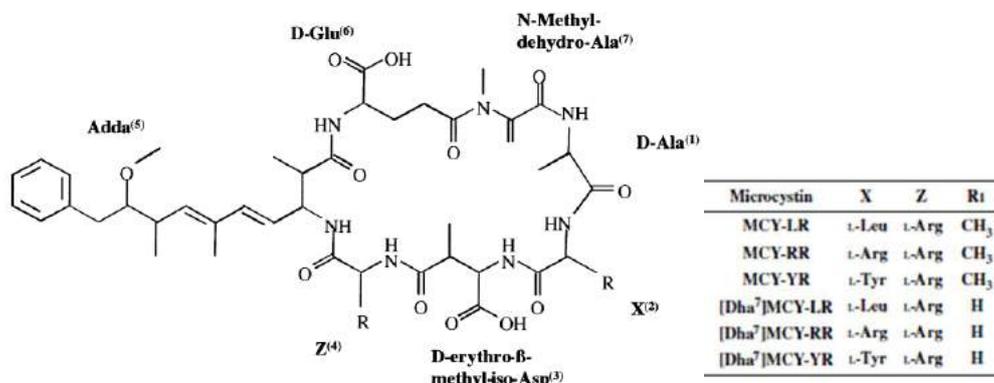


Fig. 7. Estructura general de las microcistinas. El L-amino es variable y se encuentre en la posición X y Z, como se puede ver en la tabla asociada (Tillett et al., 2000; Tanabe et al., 2009).

El complejo que transcribe para la formación de la microcistina está codificado por el cluster genético *mcy* que contiene 10 genes (Tillett et al., 2000; Fig. 8). Cada módulo de la péptido sintetasa multifuncional contiene dominios funcionales específicos para la activación y tioesterificación del aminoácido sustrato y para la elongación del péptido creciente (Tillett et al., 2000). Una vez producida la molécula, ésta tiende a permanecer en el interior celular y su exportación está estrechamente relacionada al gen *mcyH* sin el cual no puede ser exportada (Pearson, Hisbergues, Börner, Dittmann y Neilan, 2004). Está propuesto la identificación de diferentes genes como proxy de abundancia de células tóxicas debido a que una célula equivale a una copia del gen. En esta tesis se usó el gen *mcyE* como indicador de genotipo tóxico (Martínez de la Escalera et al., 2017). El gen *mcyJ* (también usado en esta tesis) es el gen más conservado y es el que usa en estudios de diversidad genética de las poblaciones del CMA. Además, debido a su estructura química, las microcistinas son extremadamente estables y pueden tolerar cambios radicales en la composición química del agua, incluso en el pH (Harada, Tsuji, Watanabe y Kondo, 1996; Harada y Tsuji, 1998).

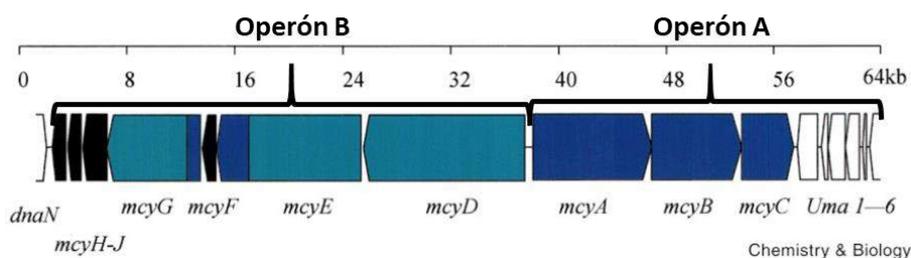


Fig. 8. Organización del cluster para la biosíntesis de microcistina (Tillet et al., 2000). Operón A: *mcyABC* y operón B: *mcyD-J*

1.1.5. Efectos de las toxinas

El mecanismo tóxico que provocan las cianotoxinas se basa en la inhibición de una actividad enzimática particular. En el caso de las microcistinas uno de los mecanismos más estudiado es el que afecta a los animales y se trata de una inhibición de enzimas fosfatasa. Estas enzimas son responsables de la hidrólisis de fosfatos en proteínas cuya actividad se regula justamente por la presencia o ausencia de dichos grupos fosfato (Barford, 1996). El desajuste entre enzimas fosfatasa y quinasa, responsables de transferir grupos fosfato, puede afectar gravemente la estructura y función celular y ha sido relacionado con el desarrollo de células cancerígenas (Cohen and Cohen, 1989). La toxina se une mediante un enlace covalente a la proteína fosfatasa, especialmente en hepatocitos y genera un daño en la estructura celular del hígado, aunque también puede afectar a otros tejidos (Sivonen et al., 1990; Harada y Tsuji, 1998; Sivonen and Jones, 1999).

En peces y anfibios se ha demostrado que la exposición de embriones a extractos de cianobacterias o toxina pura se traduce en un incremento de malformaciones (Oberemm et al., 1997; Jacquet et al., 2004). En los humanos producen gastroenteritis, daño en el hígado, existen evidencias de que concentraciones altas de microcistinas pueden producir tumores de hígado (Falconer, 1991), y en los casos más severos, la muerte (Fleming et al., 2002; Vidal et al., 2017).

Las primeras intoxicaciones de poblaciones humanas por consumo de agua contaminada con cepas tóxicas de cianobacterias fueron descritas en Australia, Inglaterra, China y África del Sur (WHO, 2003). Hasta ahora los dos episodios más graves han ocurrido en Brasil. En un episodio murieron más de 50 pacientes sometidos a tratamientos de hemodiálisis en los que se utilizó agua proveniente de un embalse con floraciones de cianobacterias en el año 1996 (Jochimsen et al, 1998). En el otro, en 1998 y en las proximidades del embalse de Itaparica, se registraron cerca de 2000 casos de gastroenteritis durante 42 días, donde el estudio demostró que el desencadenante de la epidemia eran las toxinas producidas por las cianobacterias presentes en el embalse (*Anabaena* y *Microcystis*) (Teixeira et al., 1993). Existen otros muchos episodios que pueden ser atribuidos a cianobacterias tóxicas, como el masivo brote de entre 4000 y 7000 casos de dolencias abdominales, vómitos y diarreas en Charleston (Virginia Occidental, EE.UU) en 1931 (Tisdale, 1931) o el incremento de casos de gastroenteritis en Harare (Zimbabwe) coincidente con la floración anual de *Microcystis aeruginosa* (Zilberg, 1966). Más recientemente un estudio en Uruguay, en las playas de Carrasco, en enero del 2015, donde una niña de 20 meses ingresó en un hospital de Buenos Aires luego de un episodio grave de gastroenteritis y tuvo que recibir un trasplante de hígado (Vidal et al., 2017).

1.1.6. Regulación de la producción de toxinas

Desde 1880 la temperatura media de la superficie terrestre ha subido cerca de 0,8°C, una tendencia que está impulsada en gran medida por el aumento del dióxido de carbono y otras emisiones antropogénicas en la atmósfera del planeta (IPCC, 2001). Las floraciones del CMA están asociadas a los periodos más cálidos del año, particularmente en los ecosistemas eutróficos, y con una temperatura óptima para el crecimiento y la fotosíntesis entre 25°C y 30°C (Paerl and Huisman, 2008; Kruk et al., 2018; Fig. 9).

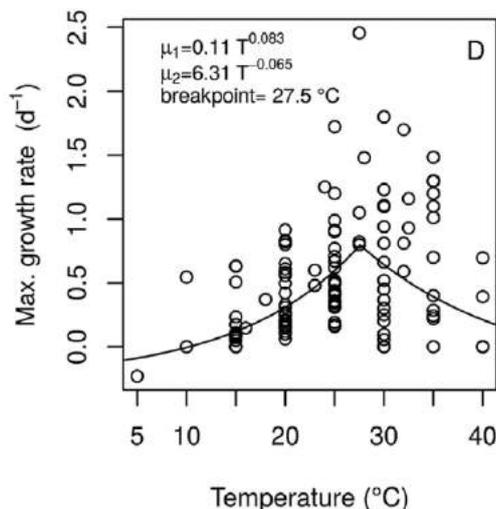


Fig. 9. Tasa de crecimiento máxima estimada con las poblaciones experimentales de la literatura. Tomada de Kruk et al. 2017.

Con respecto a los factores que regulan la producción de toxinas, los primeros estudios se centraron en aquellos comúnmente asociados a la formación y senescencia de las floraciones, tales como temperatura, nutrientes y luz (Harke et al., 2016). Estudios de laboratorio han descrito que la concentración de microcistina se obtiene en temperaturas de entre 20 y 25 °C (Watanabe and Oishi, 1985; Van der Westhuizen et al., 1986; Amé and Wunderlin, 2005); estudios realizados en campo por Martínez de la Escalera et al. (2017) también encontraron que la abundancia de genotipos tóxicos fue mayor en los periodos de altas temperaturas.

Con respecto a la concentración de nutrientes en estudios de laboratorio, Downing et al. (2005) concluyeron que la concentración de microcistinas estaba controlada por varias variables, entre las cuales el nitrógeno tenía el efecto más significativo y Harke and Gobler (2013) observaron que en condiciones de limitación de nitrógeno inorgánico se reducía la abundancia de los genes involucrados en la síntesis de microcistinas (*mcyABCDEF*) y la concentración de microcistina por célula también era menor. De la misma manera, Van de Waal et al. (2009), y también Horst et al. (2014) y Scott et al. (2014) (en estudios de campo), observaron aumentos en la concentración exógena de nitrógeno asociados con aumentos en la concentración de microcistinas. Sin embargo, otros estudios de laboratorio produjeron resultados contradictorios, durante periodos de limitación de nitrógeno observaron aumentos en la concentración de microcistina y en la expresión individual de genes *mcy* (Pimentel and Giani, 2014; Ginn et al., 2010); lo que sugiere una relación producción de toxina-nitrógeno más compleja o quizás una variabilidad entre cepas de laboratorio o especies.

Otro de los factores analizados fue la incidencia de la luz solar. En este sentido, Straub et al. (2011) demostraron que la biosíntesis de microcistina ocurría principalmente durante los períodos de luz, aunque eso fue contradecido por Penn et al. (2014) quienes encontraron que las microcistinas se producían durante el ciclo día/noche (ciclos circadianos) en las poblaciones naturales de *Microcystis*, estableciendo que la transcripción se producía durante el día y la producción en la noche. Una posible explicación a la desconexión entre la concentración de microcistina y la abundancia en la transcripción del *mcy* es que la toxina podría estar uniéndose a proteínas y por eso no sería detectable por los métodos estándares (Meissner et al., 2015). Por último, con respecto a la salinidad, en un estudio de campo realizado por Martínez de la Escalera et al. (2017), que abarcó el Río Uruguay y el Río de la Plata, demostraron que la mayor abundancia del CMA se encontraba en las aguas dulces y que esta disminuía según aumentaba la salinidad; el estrés salino resultó ser la principal variable que limitó la abundancia de genotipos tóxicos en este sistema.

1.1.7. Morfología y producción de toxinas

Diferentes estudios hallaron una relación positiva entre el tamaño de las colonias del CMA y la concentración de microcistinas, lo que sugiere que el tamaño colonial podría ser usado como indicador de la toxicidad. Varios de estos trabajos fueron estudios de campo realizados en diferentes lagos, en los que se separaron las colonias de acuerdo a su tamaño utilizando tamices con mallas de diferentes poros (entre 270 y 10 μm). El primer estudio en este tema se centró en el embalse Bautzenm (Jungmann et al., 1996) y no se detectó microcistinas en colonias menores a 66 μm y se observaron las concentraciones más elevadas en las colonias mayores a 100 μm ; con ello sugirieron que la microcistina es necesaria para el crecimiento celular o para la bioquímica de la colonia. Más tarde, Kurmayer et al. (2003) observaron que en el lago Wannsee la fracción que contenía colonias de tamaños menores a 50 μm tenía la proporción más baja de genotipos tóxicos y la concentración más baja de microcistina por célula, al contrario que la fracción que contenía colonias mayores a 100 μm . Ellos concluyeron que la variación encontrada en la producción neta de microcistina en el lago se debió a la abundancia de las colonias mayores a 100 μm productoras de microcistinas, por lo que la fluctuación en la concentración de microcistina se puede asignar al crecimiento de la población en las colonias grandes (Kurmayer et al., 2003). Finalmente, en 2007 Graham y Jones estudiaron 30 lagos del norte de Missouri e Iowa y observaron que las colonias mayores a 100 μm contribuían al 40% del total de las microcistinas. Los primeros tres estudios llegaron a la misma conclusión: las colonias más

grandes eran las más tóxicas. En un estudio más reciente, Wang et al. (2013) en el lago Taihu indicaron que las colonias entre 100 y 270 μm fueron las que alcanzaron las proporciones más altas de microcistinas, incluso con valores más elevados que en las colonias mayores a 270 μm . Esto demostró que la relación entre el tamaño de las colonias y su toxicidad no es lineal. Ellos sugirieron a las autoridades establecer un indicador de alerta de alta toxicidad frente a la ocurrencia de floraciones con organismos mayores a los 50 μm ya que el tamaño y la forma podrían ser utilizados como marcadores de la producción de toxinas y por lo tanto de la calidad del agua.

1.2. Propiedades ópticas en los cuerpos de agua

Del total de la energía solar que llega a la superficie de los cuerpos de agua, más del 90% es absorbida o transformada en diferentes tipos de energía interna (Woźniak y Dera, 2007). Aproximadamente el 50% del espectro electromagnético solar que llega a la superficie de los océanos está en la región del visible, esto corresponde a la radiación fotosintéticamente activa (PAR) comprendida entre los 400 y 700 nm de longitud de onda (Kirk 1994).

Los organismos del CMA son organismos fotosintéticos capaces de regular su contenido de pigmentos de tal manera que mejoren su desempeño con la luz a diferentes intensidades y longitudes de onda (Paerl et al., 1983). Además, tienen la habilidad de controlar su posición en la columna de agua respecto del gradiente de luz en una posición óptima para su crecimiento (Carr and Whitton, 1982).

1.2.1. Propiedades ópticas del agua

Para entender los factores que controlan la atenuación de la PAR es importante conocer las propiedades ópticas del agua. El color de los cuerpos de agua está determinado por las Propiedades Ópticas Inherentes (POIs) que no dependen de la posición de la geometría de la recepción de la luz o de la posición del detector con respecto a la superficie (Strömbeck, 2001). Las POIs más importantes en los cuerpos de agua son los coeficientes de absorción ($a(\lambda)$) y de dispersión ($b(\lambda)$) de la luz en el agua (Morel y Maritorena, 2001). A su vez estos coeficientes se pueden descomponer en otras contribuciones debido a sus diferentes componentes, donde $a(\lambda)$ es el resultado de la suma de la absorción por el fitoplancton ($a_{\phi(\lambda)}$), por partículas detríticas orgánicas y minerales ($a_{d(\lambda)}$) y la materia orgánica disuelta ($a_{g(\lambda)}$). En aguas alejadas de la costa, donde no hay re-suspensión o aportes terrestres, el fitoplancton es el principal responsable de la absorción de la luz. Las variaciones en $a_{\phi(\lambda)}$

han sido asociadas a cambios en la estructura de la comunidad y en el estado fisiológico de las células (Kirk, 1994; Bricaud et al., 2004). Por otro lado, las partículas minerales provocan una mayor dispersión de la luz, dado su mayor índice de refracción, por lo que la dispersión es más importante en la zona costera.

Además de las POIs en los cuerpos de agua se pueden definir las propiedades ópticas aparentes (POAs), las cuales dependen de las características angulares del campo de luz (ej. la altura del sol)(Montes y Mohammadpour, 2013). Entre las POAs, las más empleadas en física acuática son el coeficiente vertical de atenuación descendente de la luz (Kd) y la reflectancia del agua (Rrs (λ)). La medida del Rrs es un término central en óptica acuática y se define como la luz que se refleja del cuerpo de agua:

$$Rrs = Lw/Ed \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde Lw es la radiancia emergente justo por encima de la superficie del agua y Ed es la irradiancia descendente que alcanza la superficie del agua. Lw aumenta con la reflectancia del agua debido a las partículas y disminuye con la absorción de la luz debido al material disuelto de color y/o partículas (Strömbeck, 2001; Fig. 10).

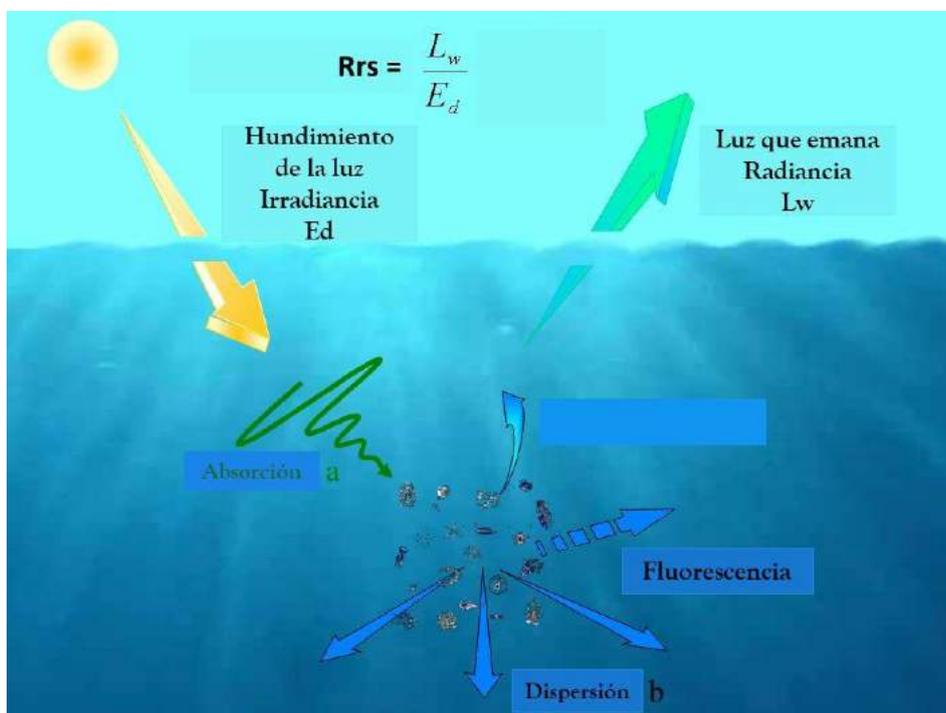


Fig. 10. Esquema de los componentes del Rrs (ecuación 1). Esquema modificado de <http://slideplayer.com/slide/10871053/>

1.2.2. Propiedades ópticas del fitoplancton

Las propiedades ópticas del fitoplancton varían acorde a su morfología (tamaño, forma, presencia de vesículas de gas, mucílago, etc.) (Reynolds, 2006). Organismos de diferentes tamaños y formas tienen distintos rasgos bio-ópticos, como los coeficientes de absorción específica (Montecino et al., 2008). Los pigmentos del fitoplancton se utilizan para caracterizar el estado fisiológico, la composición de especies y la biomasa en el ambiente acuático (Falkowski y Raven, 1997). La concentración de pigmentos es la fuente dominante de variabilidad en la absorción por el material particulado en el agua y la clorofila-a es el pigmento en mayor proporción en el fitoplancton. Por esta razón, para poder describir su variabilidad es conveniente normalizar la absorción del fitoplancton ($a_{\phi(\lambda)}$) por clorofila-a, obteniendo así el coeficiente de absorción específico del fitoplancton ($a^*_{\phi(\lambda)}$). Mayores concentraciones de clorofila-a están relacionadas con células de mayor tamaño y con menores valores de $a^*_{\phi(\lambda)}$ (Barocio-Leon et al., 2006).

La estructura comunitaria del fitoplancton afecta a las propiedades ópticas de las aguas superficiales (Ciotti et al., 2002). La dispersión de la luz por el fitoplancton está profundamente influida por la estructura de los organismos y esta por el tamaño y morfología celular (Svensen et al., 2007; Whitmire et al., 2010). Por ejemplo, las vacuolas de gas intracelulares que contienen los organismos del CMA tienen efecto pronunciado en la interacción con la luz (Ganf et al., 1989; Matthews y Bernard, 2013), ya que aumentan su dispersión y generan altos valores de Rrs en las floraciones superficiales, lo que disminuye la zona fótica del ecosistema perjudicando a otros grupos del fitoplancton (Olivier y Ganf, 1988; Matthews y Bernard, 2013).

1.2.3. Sensoramiento remoto basado en propiedades ópticas

La preocupación a nivel mundial sobre las floraciones de cianobacterias ha creado la necesidad de monitoreo más precisos y análisis de muestras más rápidos para generar medidas de gestión más ajustadas. Los métodos convencionales de monitoreo de agua han comenzado a ser complementados con técnicas independientes del operador (Leppänen et al., 1995) o áreas (Dekker et al., 1992) y por sensoramiento remoto con satélites (Kutser et al., 2006). En particular, el avance en la tecnología de sensoramiento remoto mediante satélites ha permitido su uso para la identificación de grupos de fitoplancton nocivos que incluyen cianobacterias en aguas salobres y de agua dulce (Dekker et al., 1992; Kutser et al., 2006; Metsamaa et al., 2006).

Con el surgimiento de los sensores remotos de color del océano, que permiten estimar la concentración de clorofila-*a* en la primera profundidad óptica (profundidad a la cual se origina un 90% de la radiancia ascendente que viene del agua y que llega al sensor remoto), se ha incrementado la necesidad de entender la magnitud y las fuentes de variación de las propiedades ópticas de las partículas en las capas superficiales de los océanos (Sosik y Mitchell, 1995). Así, la aplicación del sensoramiento remoto es importante para el entendimiento y el monitoreo del ecosistema y de los ciclos biogeoquímicos. Algunos de sus usos actuales son: el mapeo de la concentración de clorofila; la determinación de la fisiología, fenología y grupos funcionales del fitoplancton; el monitoreo de las comunidades de fitoplancton debido al cambio climático y la detección de floraciones dañinas de cianobacterias o de eventos de contaminación (Mobley, 1999; Hogue et al., 2012; Blondeau-Patissier, Gower, Dekker, Phinn y Brando, 2014; Soja-Woźniak, Darecki, Wojtasiewicz y Bradtke, 2017).

La amplia gama de sistemas de Teledetección existentes (películas sensibles, radiómetros, radares, etc.) y las diversas plataformas desde donde actúan (globos, aviones, satélites, etc.) constituyen un avanzado sistema integrado de informaciones de gran apoyo logístico y científico para el estudio del medio natural en diferentes niveles, tales como usos del suelo, costas, bosques, recursos acuáticos, etc (García-Consuegra, 2012). El conjunto de los datos obtenidos vía teledetección tienen una naturaleza geográfica, física y radiométrica distinta de las informaciones recogidas por los métodos convencionales. La información de teledetección puede ser repetitiva y muy global, pues toma en consideración de forma simultánea un elevado número de variables relativas al medio ambiente (Sacristán, 2006). Además, las imágenes satelitales conllevan dos grupos de errores. Errores de tipo radiométricos que modifican el valor real de la energía captada por el sensor del satélite y errores de tipo geométricos, que modifican la geometría de la imagen. Asimismo, muchas veces los datos no se pueden obtener por alta intensidad de nubes o es necesario una separación entre nubes lo suficientemente grande como para no poseer umbrales de confusión (García-Consuegra, 2012).

La información sobre los constituyentes ópticos activos presentes en una parcela de agua puede ser obtenida a través de su espectro de reflectancia. Las bandas espectrales en el azul, verde, amarillo, rojo o cerca del infrarrojo, del espectro de reflectancia, pueden usarse de diferentes formas en la detección de las floraciones algales (Blondeau-Patissier et al., 2014). Los algoritmos que dependen, fundamentalmente, de la detección específica de las características espectrales se ajustan bien para las floraciones algales de expresiones superficiales. Este enfoque puede ser suficiente para

discriminar las floraciones algales de otros fenómenos naturales (Siegel et al., 2007). Una alternativa al empleo de sensoramiento remoto usando los sistemas satelitales es el uso de cámaras digitales como herramientas de sensoramiento remoto sencilla y de bajo costo. La información generada debe ser útil para predecir la ocurrencia y la intensidad de las floraciones, y para desarrollar planes de manejo y/o evitar o disminuir sus efectos negativos. Sin embargo, no existen en la actualidad herramientas de monitoreo de bajo costo y de fácil implementación que sean aplicables a la gestión y a la predicción de su abundancia y toxicidad (Alonso et al, 2008). El interés por el uso de las cámaras digitales como herramienta de sensoramiento remoto ha aumentado en los últimos años debido a que con estos instrumentos ópticos es posible expresar la energía de cada banda de una manera relativa (Goddijn y White 2006; Goddijn-Murphy et al. 2009; Hogue et al. 2012). Las cámaras comerciales son herramientas sencillas y baratas capaces de medir la energía lumínica en las bandas roja, verde y azul del espectro (Goddijn-Murphy et al., 2009). En aguas costeras del oeste de Irlanda, Goddijn y White (2006) encontraron relaciones positivas entre distintos indicadores del agua y cocientes entre distintas bandas obtenidas con cámara digital por ejemplo entre el coeficiente de absorción a 440nm de materia orgánica disuelta coloreada (CDOM) y la relación del rojo/azul, y la concentración de cl-a y la razón azul/verde. Correlaciones entre la razón azul/verde y valores de cl-a también fueron demostradas en aguas claras de Filipinas (Beckett, 2005).

Las diferentes especies de fitoplancton pueden absorber la luz a diferentes longitudes de onda y dispersarla también de forma dispar. Por lo tanto, basándonos en la toma de fotografías digitales estas características se pueden usar potencialmente para distinguir diferentes grupos taxonómicos si la resolución espectral es suficientemente fina (Soja-Woźniak et al., 2017). Con la fotografía se puede obtener información espectral de la luz y de la energía originada del agua para estimar la composición de la comunidad de fitoplancton y de los componentes ópticos disueltos y particulados no-algales. Asimismo las imágenes se pueden utilizar para obtener información adicional mediante la identificación de la macro-morfología de los organismos de las cianobacterias (Woźniak et al., 2016). Ambos datos se podrían relacionar con la toxicidad de las cianobacterias en los cuerpos del agua. En la figura 11 se muestra el valor del R_{rs} calculado a través de la ecuación 1 que es posible utilizar en los sistemas acuáticos mediante el sensoramiento remoto a través de cámaras comerciales.

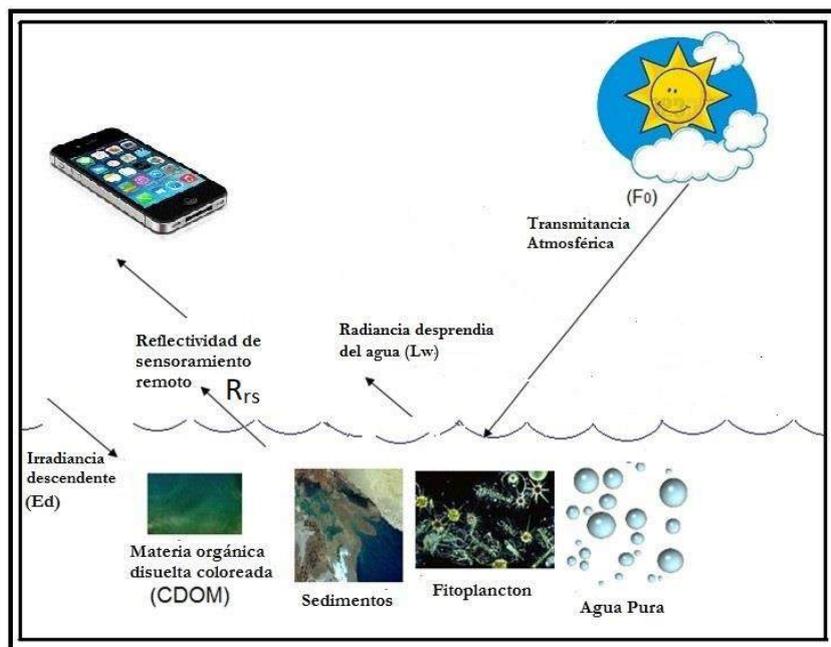


Fig. 11. Esquema de la energía óptica entre las fases agua y aire. Esquema modificado de una clase impartida por Ariadna Gonzalez en Ensenada en el 2015.

Hasta el momento las características morfológicas, de potencial tóxico y ópticas han sido estudiadas de manera individual o a pares. Desde nuestro conocimiento, este es el primer estudio que aborda la interacción entre las propiedades ópticas y la abundancia de genotipos tóxicos y la interacción de las tres características en su conjunto. Este abordaje es novedoso por conjugar las tres características con el objetivo de generar un modelo de detección del potencial tóxico del CMA en los cuerpos de agua.

La tesis se centra en conocer y vincular las características morfológicas, ópticas y de toxicidad de poblaciones del CMA provenientes del embalse de Salto Grande. Este constituye un represamiento del Río Uruguay de carácter binacional (Uruguay-Argentina) que se construyó para la generación de energía hidroeléctrica en 1979 (Chalar y De León, 2003). Este ambiente fue elegido ya que sufre eventos de floración durante todo el año, lo que permite evaluar estas floraciones en distintas estaciones. Además, otros estudios realizados en el embalse por nuestro grupo de investigación proporcionan un marco empírico y teórico a esta aproximación (Martínez de la Escalera et al., 2014,2017; Segura et al., 2017; Kruk et al., 2017; Alcántara et al. en revisión).

1.3. Hipótesis

La hipótesis general de trabajo de esta tesis se basa en la morfología de los organismos del CMA como vínculo entre las propiedades ópticas y potencial tóxico de las comunidades de fitoplancton. Dado que se ha descrito que en comunidades dominadas por el CMA existe relación tanto entre la morfología y el potencial para producir toxinas como entre la morfología y las propiedades ópticas, la adquisición remota de imágenes de la superficie del ecosistema posibilitará estimar el potencial tóxico de una comunidad de CMA.

1.4. Objetivo

En este marco el objetivo general de la tesis es relacionar la morfología (i.e. tamaño) con sus propiedades ópticas (i.e. Rrs verde) y con la toxicidad potencial (abundancia y expresión de genes que codifican para microcistinas) y real (concentración de microcistinas) de los organismos de comunidades naturales de fitoplancton dominada y no dominada por el CMA.

La presente tesis incluye una introducción general (cap. 1) y tres capítulos que abordan los siguientes aspectos:

Análisis de la relación entre la morfología de organismos de CMA (desde células individuales hasta colonias de gran tamaño) y abundancia de genes de toxicidad, concentración de microcistinas y diversidad de genotipos tóxicos (cap.2). Para este capítulo serán importantes una serie de conceptos que quedan resumidos en la tabla 2, la cual será referida a lo largo del texto. Además, este capítulo se divide en dos sub-capítulos: En el 2.1 analiza esta relación en muestras de agua obtenidas en un gradiente ambiental amplio que incluyó desde Salto Grande hasta Punta del Este. En el 2.2 se analiza la relación tamaño - toxicidad mediante nueve campañas de muestreos a lo largo de un año y medio centrados en el embalse de Salto Grande. En este caso las muestras se tamizaron manualmente para cuantificar el biovolumen, las copias por ml del gen *mcyE*, la concentración de microcistinas y la diversidad de genotipos tóxicos en cada fracción por separado (Tabla 2).

Evaluación de la aplicación para el análisis de espectros de luz reflejada por las muestras de agua con y sin organismos del CMA (cap. 3). Las imágenes obtenidas con la aplicación del teléfono móvil se relacionaron con los resultados del segundo capítulo con la intención final de generar un modelo matemático de detección de floraciones potencialmente tóxicas.

La tesis se cierra con un cuarto capítulo de conclusiones y perspectivas (Fig. 12).

Objetivo específicos:

- Analizar estadísticamente la relación entre la abundancia de genotipos tóxicos (copias por ml del gen *mcyE*) y el tamaño de los organismos del CMA a lo largo de un gradiente ambiental amplio en términos de salinidad. Para este objetivo se hace uso de los datos de un proyecto anterior de nuestro grupo de investigación (proyecto ALGAS).
- Caracterizar la morfología de comunidades de fitoplancton con floraciones de CMA en las muestras del embalse de Salto Grande; estimar su abundancia, biovolumen, concentración de clorofila-a, ficocianina y de microcistinas.
- Cuantificar la concentración del gen *mcyE*, involucrado en la síntesis de microcistinas, en las muestras de agua entera y en las distintas fracciones de tamaño caracterizadas en el capítulo 2.
- Caracterizar las propiedades ópticas de CMA y de las variables ambientales en el embalse de Salto Grande.
- Determinar la relación entre la morfología, la abundancia de genotipos tóxicos y las propiedades ópticas de las cianobacterias y el medio que rodea a los organismos para evaluar su relación con las condiciones ambientales.
- Generar un modelo de detección de genotipos tóxicos mediante sensoramiento remoto.

Tabla 2. Descripción de las siglas utilizadas en los capítulos

Nombre / Sigla	Descripción	Unidades
Complejo <i>Microcystis Aeruginosa</i> CMA	Complejo <i>Microcystis aeruginosa</i>	
Máxima Dimensión Lineal (MLD)	Es la mayor dimensión lineal en las medidas obtenidas en el microscopio entre el valor de largo, ancho y profundidad. En general siempre corresponde al largo de la colonia.	μm
Volumen (V)	Volumen de la colonia	μm^3
Área (S)	Área de la colonia	μm^2
S/V	Cociente entre el área y el volumen	
Biovolumen (Bv)	Indicador de la biomasa total del CMA = abundancia * Volumen	$(\mu\text{m}^3/\text{ml})$

<p>Abundancia (ab)</p>	<p>Es la densidad de organismos y se mide como: abundancia = $(n^{\circ} \text{ contado} \cdot V_{\text{concentrado}} \cdot \text{area cámara}) / (V \text{ cámaras} \cdot V_{\text{filtrado}} \cdot n^{\circ} \text{ bandas} \cdot \text{area banda})$ abundancia 23 (filtro entero) = $(n^{\circ} \text{ contado} \cdot V_{\text{filtrado filtro}}) / V_{\text{filtrado total}}$ en el caso de todo el filtro abundancia 23 (parte de un filtro) = $(n^{\circ} \text{ contado} \cdot V_{\text{filtrado filtro}} \cdot \text{área del filtro}) / (V_{\text{filtrado total}} \cdot \text{area foto})$</p>	<p>org/ml</p>
<p><i>mcyE</i></p>	<p>Abundancia de genotipos tóxicos</p>	<p>copias/ml</p>
<p><i>mcyJ</i></p>	<p>Utilizado para analizar la diversidad de genotipos tóxicos (mediante la técnica del HRMA)</p>	



Fig. 12. Esquema resumen de la estrategia de la tesis y principales preguntas que pretende responder

Capítulo 2: Potencial tóxico y morfología de organismos del CMA

Capítulo 2.1. Potencial tóxico y morfología de organismos del CMA en un gradiente ambiental desde el Río Uruguay al Río de la Plata

2.1.1. Antecedentes

El objetivo de este primer capítulo fue el análisis estadístico de la relación entre la abundancia de genotipos tóxicos y el tamaño de los organismos del CMA. Para ello se utilizaron los datos de biovolumen, abundancia del gen *mcyE* y de cuatro variables ambientales de un proyecto anterior realizado por nuestro grupo de investigación para analizar la relación entre toxicidad y morfología mediante modelos de regresión múltiple (Martínez de la Escalera et al., 2017; Segura et al., 2017; Kruk et al., 2017). Este proyecto tenía como objetivo el desarrollo de nuevas técnicas para la detección, el monitoreo y la predicción de floraciones de fitoplancton nocivo en dos de los principales cursos de agua de Uruguay; el Río Uruguay y el Río de la Plata. En este marco se evaluaron diferentes condiciones ambientales ya que se analizó desde el embalse de Salto Grande a Punta del Este, se incluyó además Fray Bentos, Carmelo, Colonia y Montevideo en un gradiente de salinidad que fue de 0 a 33.

2.1.2. Materiales y métodos

Área de estudio y muestreo

Se utilizaron los datos de 3 campañas (enero y junio del 2013 y marzo 2014) donde se evaluaron 6 puntos (o estaciones) distribuidos desde el embalse de Salto Grande en el Río Uruguay hasta Punta del Este en el Río de la Plata (Fig. 13). Se tomaron medidas *in situ* de variables meteorológicas, oceanográficas y limnológicas. La dirección e intensidad del viento (en ms^{-1} y estimado en base a la escala de Beaufort) se midió a 1m sobre la superficie del agua con un anemómetro. La temperatura ($^{\circ}\text{C}$), turbidez (nephelometric turbidity units: NTU), salinidad y conductividad se midieron con un CTD marca SeaBird 19 plus. Se registró visualmente la presencia de floraciones (definidas como manchas verdes) y se tomaron muestras de agua, con botella Niskin sub-superficialmente, para análisis de las comunidades fitoplanctónicas (morfología y genes).

Se realizaron arrastres con red de poro de 25 μm para analizar cualitativamente la composición específica de la comunidad de fitoplancton. Estas muestras fueron fijadas con formol y guardadas frescas. Para la colecta de fitoplancton de gran tamaño, en particular organismos de cianobacterias, se realizaron arrastres con red cónica de 115 μm de malla y una boca de 30 cm de diámetro. Los arrastres tuvieron una duración de aproximadamente 2 minutos y el volumen filtrado se midió con un flujo-metro calibrado. Se filtraron en promedio 7000 litros de agua por duplicado en cada sitio de muestreo. Estas muestras fueron fijadas con formol 4% neutralizado y utilizadas para analizar la morfología. En estas muestras colectadas con la red de 115 μm se registró la presencia de colonias de cianobacterias a simple vista (Martínez de la Escalera et al., 2017; Segura et al., 2017; Kruk et al., 2017).

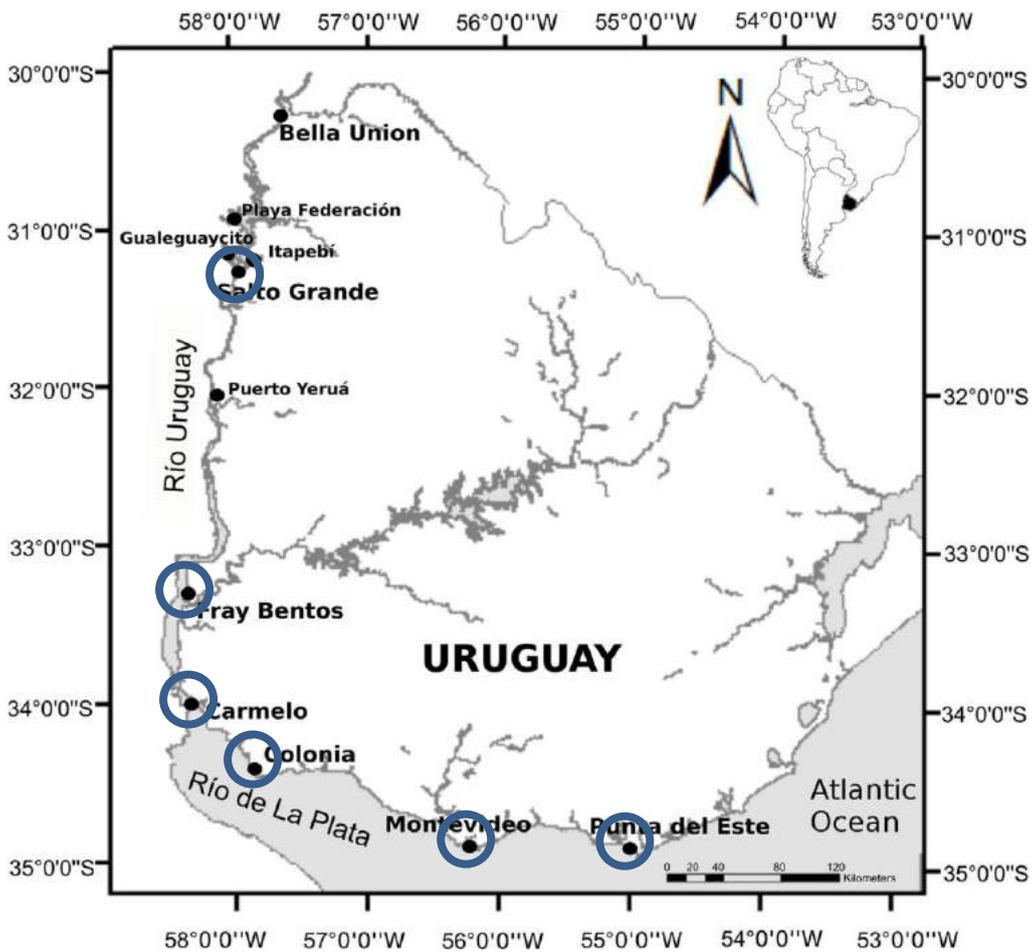


Fig. 13. Mapa de los sectores del río Uruguay y del Río de la Plata. Los círculos azules fueron los sitios de los que se utilizó datos en este proyecto.

Identificación, conteo y biovolumen de fitoplancton

Los organismos del CMA de botella y de red se contabilizaron y midieron en microscopio invertido Olympus IX81, el cual tiene integrada una cámara CCD de alta velocidad (Olympus DP71). Las muestras de botella se sedimentaron en cámaras Utermöhl (5, 10, 15 mL) de acuerdo a la concentración de la muestra. Se realizaron conteos por bandas hasta alcanzar 100 organismos de la especie más abundante o 400 organismos en total. El conteo de las muestras de red se hizo en cámaras Sedgewick-Rafter de 1 mL. Se evaluaron bandas y se contaron un máximo de 100 colonias del complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) o hasta analizar cuatro cámaras completas cuando la abundancia no alcanzó las 100 colonias.

Las medidas de todos los organismos del CMA, desde las células individuales hasta las colonias, fueron registradas a partir de microfotografías tomadas con el software Cell-F (Olympus) e incluyeron largo (A), ancho (B) y profundidad (C, μm). La medida de profundidad se realizó moviendo el micrómetro del microscopio desde la primera célula visible hasta la última célula visible. Con las tres medidas se calculó el volumen (μm^3), la superficie individual (μm^2) y la relación superficie/volumen (S/V) donde se utilizó la forma de esferoide prolado como la aproximación geométrica más adecuada a las células y colonias de CMA (Hillebrand *et al.*, 1999). Además se consideró la dimensión lineal máxima (MLD, μm) como rasgo de la morfología individual. El biovolumen (Bv) se utilizó como indicador de biomasa multiplicando la abundancia por el volumen específico de los organismos ($\mu\text{m}^3\text{ml}^{-1}$).

Determinación de la abundancia de genotipos tóxicos

- **Extracción de ADN**

El método empleado para la puesta a punto se basó en el descrito por Zhou *et al.* (1996) y desarrolló en el departamento de microbiología del instituto Clemente Estable (Martínez de la Escalera *et al.*, 2017). Para ello, 250-300 ml de agua se filtraron a través de filtros de membrana de celulosa de 0.2 μm de tamaño de poro. Los filtros se almacenaron en placas de Petri estériles a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su empleo para extracción de ADN. Una vez extraído el ADN y confirmada su calidad por espectrofotometría se almacenó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su empleo en qPCR. Los parámetros determinados para luego cuantificar el número de copias fueron el volumen filtrado de muestra y la cantidad total, y concentración del ADN

obtenido por muestra.

- **PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)**

El PCR en tiempo real se ajustó utilizando primers específicos previamente diseñados (Tabla 3). Para las reacciones se utilizó el kit Power SYBR Green PCR (Invitrogen) con un volumen final de reacción de 20 µl: 9,5 µl de agua, 0,5 µl de BSA (30mg ml⁻¹), 7,76 µl de mix (Power SYBR Green PCR), 0,12 µl de cada primer (50 µM) y 2 µl de ADN de la muestra. El termociclador utilizado para los ensayos de qPCR fue Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO RAD). Previamente, nuestro grupo de trabajo evaluó el empleo de esta metodología para cuantificar 4 genes, *mcyE*, *J*, *D* y *B*. En esta tesis se trabajará con el gen *mcyE* por ser el que mostró mejores resultados, ya que los primers empleados son los más adecuados para la comunidad de CMA encontrada en Uruguay (Gabriela de la Escalera et al., 2017; tabla 3).

Tabla 3. Primers empleados para amplificar el gen *mcyE*, involucrado en la síntesis de microcistinas, mediante qPCR en tiempo real.

Objetivo del gen	Nombre del primer	Secuencia	Referencias
<i>mcyE-Microcystis spp.</i>	<i>mcyE_F</i> <i>mcyE_R</i>	AAGCAAAGCTGCTCCCGGTATC CAATGGGAGCATAACGAGTCAA	Sipari et al., 2010

- **Curva de calibración y cuantificación del número de copias génicas**

La eficiencia de amplificación de los genes se determinó mediante el empleo de vectores (plásmidos) que contienen los fragmentos génicos amplificados clonados (Tabla 3). Para cuantificar el número de copias de cada gen en las muestras se realizaron diluciones seriadas de -10 a -100000 de los genes clonados y se determinó el número de copias. Una vez conocido el número de copias génicas que contenía cada reacción de PCR se calculó el número original de copias en la muestra (basados en el volumen filtrado y el rendimiento de ADN obtenido).

Análisis de datos

Los datos de biovolumen obtenidos de las muestras de botella y de red se combinaron para reflejar el amplio espectro de tamaños que pueden alcanzar los organismos de CMA. El biovolumen fue luego organizado en clases de tamaños, cuatro categorías, de acuerdo a con la bibliografía: 0-50, 50-100, 100-200 y >200 µm. Para evaluar la relación entre la temperatura del aire y del agua, entre la MLD y

el volumen y entre la MLD y la relación S/V se ajustaron modelos de regresión lineal. Se utilizaron correlaciones no paramétricas de Spearman (r) para evaluar la relación entre el biovolumen total y la abundancia de genotipos. Se modeló la abundancia de genotipos tóxicos en función de las variables ambientales y el biovolumen de CMA utilizando tres modelos lineales generalizados (GLM) con distribución gaussiana y función link de identidad. En el primer modelo se incluyeron solamente las variables ambientales viento, temperatura, turbidez y conductividad); en el segundo modelo el biovolumen de las diferentes fracciones, y en el tercer modelo las variables ambientales y el biovolumen. Para cada caso los mejores modelos fueron identificados mediante pasos utilizando la selección *backward* y comparando los resultados utilizando el criterio información de Akaike (AIC) (Burnham and Anderson, 2002). Para calcular el pseudo R^2 del GLM se calculó mediante la función Nagelkerke R^2 (R Core team, 2017). Todo los análisis estadísticos se realizaron con el programa libre R, versión 3.0.2 (R Core Team, 2017). Para los gráficos se usó el paquete *ggpubr* (Kassambara, 2016).

2.1.3. Resultados

Caracterización ambiental

En el proyecto ALGAS se obtuvieron amplios rangos de la temperatura superficial del agua desde 11 a 34 °C; la cual estuvo linealmente relacionada con la temperatura del aire ($T_{\text{agua}}(^{\circ}\text{C}) = 4.3 + 0.69 T_{\text{aire}}$, $R^2 = 0.61$). El viento varió entre situaciones de calma (0 ms^{-1}) y brisa fresca (9 ms^{-1}). La salinidad también presentó un amplio rango que varió desde un mínimo de 0 en la parte interior del Río de la Plata (Salto, Fray Bentos, Carmelo y Colonia) y un máximo de 33 en Montevideo y Punta del Este. La turbidez varió entre 0 y 187 UNT con mayores valores en Carmelo y Colonia. El resumen de los valores de estas cuatro variables puede verse en la tabla 4.

Tabla 4: Resumen de los valores de las cuatro variables ambientales utilizadas que se van a utilizar en esta tesis: temperatura, turbidez, salinidad y viento.

	Temperatura (°C)	Turbidez (NTU)	Salinidad	Viento (m/s)
Media	19.5	40.4	6.3	3.9
Mínimo	11.0	0	0	0.3
Máximo	33.6	141	30	8.5

Tamaño y toxicidad del CMA en el gradiente ambiental estudiado

Se observó un amplio rango de la MLD de organismos del CMA, desde células simples hasta las colonias macroscópicas (desde 4 hasta 2000 μm), así como también en términos de abundancia y biovolumen (desde $3,66\text{E}^{-01}$ hasta $3,57\text{E}^{+08}$). La relación entre los rasgos morfológicos (MLD, volumen y S/V) mostró una relación positiva y significativa con el volumen de las colonias y una relación negativa con la relación S/V característicos de la ecología funcional del CMA (Fig. 14).

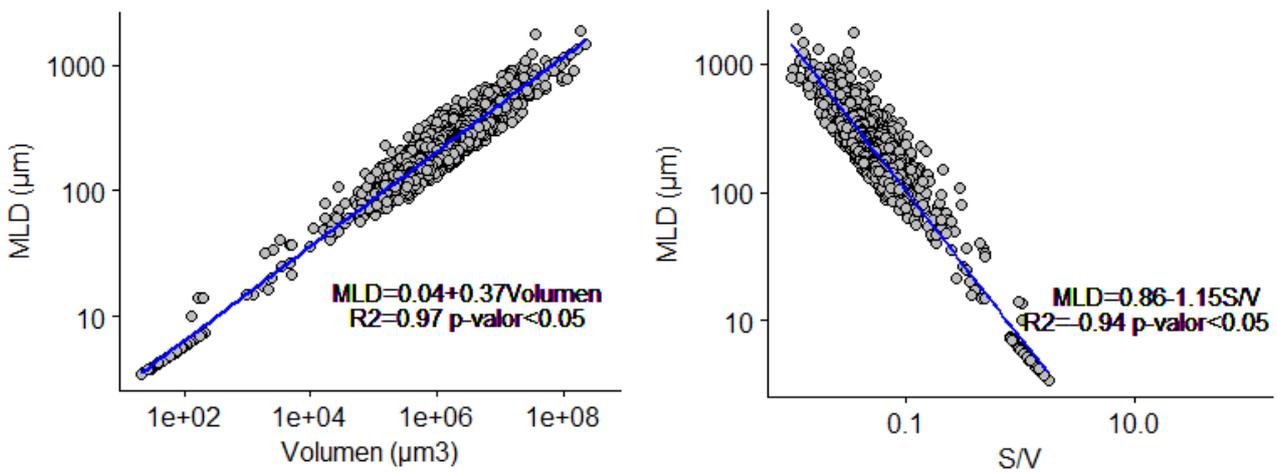


Fig. 14. En la gráfica de la izquierda se representa la relación entre el volumen y la MLD (dimensión lineal máxima). En la gráfica de la derecha la relación entre superficie/volumen (S/V) y MLD. Las líneas azules son las líneas de regresión (ajustes del modelo). Todos los ejes están en \log_{10} .

Todos los biovolúmenes estuvieron relacionados entre sí. La abundancia de genotipos tóxicos, cuantificada a través de qPCR *mcyE*, mostró una correlación positiva y significativa con el biovolumen (Fig. 15).

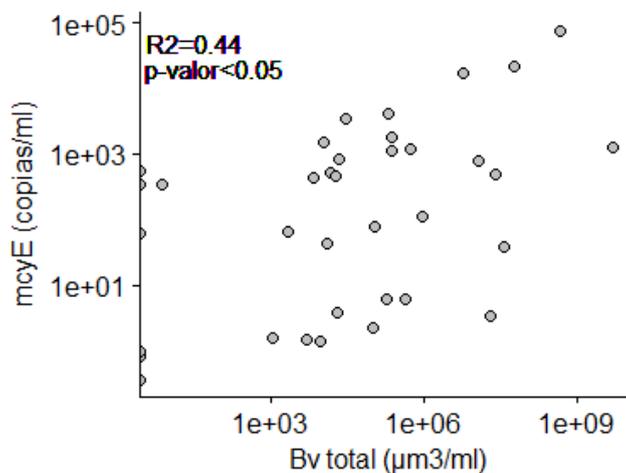


Fig. 15. Correlación entre el biovolumen y la abundancia de genotipos tóxicos (*mcyE*). Ambos ejes están en \log_{10} .

Para ahondar en la relación entre la morfología y la abundancia de genotipos tóxicos y estudiar la variable que explicó la variabilidad en la abundancia de genotipos tóxicos totales se construyó un modelo de regresión lineal múltiple (RLM). Los resultados mostraron, en base al criterio de AIC, que las variables que explican la variabilidad en la abundancia de genotipos tóxicos son el biovolumen de la fracción de tamaño entre 100 y 200 μm y la temperatura. Además, el modelo que conjugó variables ambientales y morfológicas, resultó ser el más preciso para explicar dicha variabilidad (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de los modelos construidos para explicar la abundancia de genotipos tóxicos estimada como *mcyE* en agua. Se muestra el mejor modelo seleccionado con la función STEP AIC para cada grupo de variables explicativas: ambiente, biovolumen y la combinación de ambas. En el encabezado de las dos primeras columnas se incluyen las variables inicialmente evaluadas en cada caso. Los porcentajes corresponden al pseudo R^2 , expresado en porcentaje significativos, para p -valor < 0.05 . Bv corresponde al biovolumen y K corresponde a conductividad.

y/x	Ambiente (T agua, Turbidez Viento, K)	Bv (total y fracciones)	Bv + ambiente
<i>mcyE</i>	-1.28 + 0.18 T agua $R^2=86\%$ // AIC = 84.24	1.44 + 0.66 BV ₁₀₀₋₂₀₀ $R^2=57\%$ // AIC = 113.26	-2.01 + 0.17 T agua + 0.14 BV ₁₀₀₋₂₀₀ $R^2=88\%$ // AIC = 81.6

2.1.4. Discusión

Nuestros resultados mostraron que existe una relación positiva entre el biovolumen de distintas clases de tamaño de CMA y la abundancia total de genotipos tóxicos estimada como abundancia del gen *mcyE*. En particular, las colonias de tamaño mediano grande (100-200 μm) mostraron ser la variable que mejor explica la variabilidad en la abundancia de genotipos tóxicos. A medida que el biovolumen de la fracción de tamaño mediano aumente se estimara que la abundancia de genotipos tóxicos aumentaría. Estos resultados fueron acordes con lo descrito en la literatura por Wang et al. (2013). Asimismo, la temperatura tuvo un papel clave en explicar la variabilidad de genotipos tóxicos como ya fue descrito en trabajos anteriores (Martinez et al., 2017). Estos primeros resultados, meramente descriptivos, nos indican que las diferencias en la abundancia de genotipos tóxicos en distintas fracciones pueden deberse a una diferencia fenotípica-genotípica o a una diferencia en la producción de células tóxicas acorde al momento del crecimiento en el que se encuentre la colonia. Más estudios en esta dirección son necesarios para ahondar en los mecanismos fisiológicos que explican este fenómeno.

Capítulo 2.2. : Potencial tóxico y morfología de organismos del CMA en el embalse de Salto Grande

2.2.1. Introducción

El embalse de Salto Grande es uno de los ecosistemas más afectados por las floraciones de cianobacterias en Uruguay. Las floraciones de CMA en el embalse han causado grandes problemas para la industria, recreación, turismo y para el consumo del agua. La toxicidad de estas floraciones se ha evaluado a intervalos irregulares desde 1999 y se han obtenido resultados positivos (Chalar et al., 2002).

El estudio de la relación entre la toxicidad y el tamaño de los organismos del CMA beneficia a los programas de monitoreo del agua y a la evaluación de riesgos. Para comprender esta relación se analizaron la abundancia, expresión y diversidad de genotipos tóxicos y la concentración de microcistinas en distintas fracciones de tamaños coloniales del CMA colectadas en el embalse de Salto Grande. Después de comprobar estadísticamente la correlación entre la abundancia de genotipos tóxicos y el tamaño de los organismos en el capítulo 2.1. se continuó con el estudio de esa relación mediante un nuevo set de datos donde las muestras de agua superficial se tamizaron de manera manual. Como se mencionó anteriormente diferentes estudios estudiaron la relación entre el tamaño de las colonias y el potencial tóxico. Hubo dos estudios que analizaron la abundancia de genotipos tóxicos: en el lago Wannsee por el equipo de Kurmayer et al. (2003) quienes dividieron las colonias en tres fracciones (<50, 50-100, >100 μm) y en el lago Taihu por el equipo de Wang et al. (2013) quienes dividieron las colonias en cuatro fracciones (>270, 100-270, 50-100, <50 μm). Sin embargo en estos estudios no se midieron las colonias por microscopía. Además, el equipo de Wang et al. (2013) también estudió la composición genotípica del gen *mcyJ* en los diferentes tamaños coloniales mediante la técnica de la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE). En el caso de esta tesis se dividieron los organismos en cuatro fracciones, la diferencia fue que nosotros añadimos una fracción menor a 20 μm para estudiar la ecología de las células sueltas, lo que no había sido estudiada en los estudios anteriores. En esta tesis también se analizó la composición genotípica del gen *mcyJ*, para poder estudiar la diversidad genotípica entre las diferentes fracciones de tamaños, pero mediante la técnica de *High Resolution Melting Analyses* (HRMA) que es una técnica de biología molecular basada en el estudio y comparación de curvas de desnaturalización de

las cadenas de ADN en relación al aumento de la temperatura. Además, una característica a destacar de nuestro estudio es que se muestreó durante un año y medio y en cuatro estaciones y no solo durante tres meses y en un sitio de muestreo como en los estudios previos; de tal manera que esto permitió ampliar la visión ecológica de nuestros resultados al estudiar las diferentes estaciones con presencia y ausencia de floraciones.

2.2.2. Materiales y métodos

Área de estudio

El embalse de Salto Grande constituye un represamiento del Río Uruguay de carácter binacional (Uruguay-Argentina) que se construyó para la generación de energía hidroeléctrica en 1979 (Chalar y De León, 2003). Está ubicado en el curso medio del río Uruguay, a unos 15 km al norte de las ciudades de Salto (Uruguay) y Concordia (provincia de Entre Ríos, Argentina) al norte de Uruguay y Argentina (Fig. 16). Sus características se detallan en la tabla 6 (Chalar y De León, 2003).

Tabla 6. Características morfométricas del Embalse Salto Grande (Chalar y De León, 2003).

Superficie	780 km ²
Volumen	5109 x 10 ⁶ m ³
Profundidad media	6.4 m
Profundidad máxima	35.0 m
Tiempo de residencia promedio	11.3 días

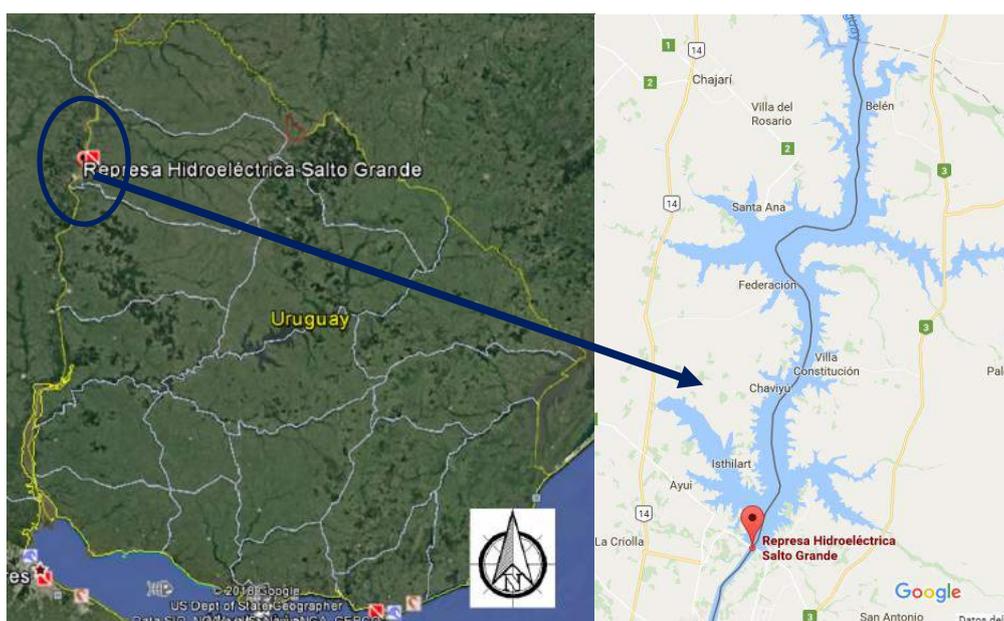


Fig. 16. Geo-representación del embalse de Salto Grande.

El Río Uruguay, principal tributario del embalse de Salto Grande, nace en Brasil (estado de Santa Catarina) y desemboca en el Río de la Plata. Las diferentes secciones del curso del río tienen condiciones hidrológicas diferentes. En la cabecera, las inundaciones ocurren entre junio y octubre. Las descargas medias son 4739 m³/s con valores extremos de mínimos 92 y máximos de 36100 m³/s (O'Farrell e Izaguerri, 2014). En la cabecera del río, la agricultura procede de la soja, maíz y de las judías negras. En el tramo medio y desembocadura, la ganadería extensiva y la agricultura de la soja y del arroz prevalecen. Solo algunos fragmentos del antiguo bosque permanecen a lo largo de los valles del río. En la cuenca del río de la sección brasileña, la vegetación primaria y secundaria cubre solo el 17.5% del suelo. Las áreas reforestadas, principalmente pinos (*Pinus elliottii*), ocupan otro 3%. Con la excepción de unos pequeños parches que permanecen como bosque primario, prácticamente la región completa ha sido replantada por vegetación secundaria, campos de cultivo y tierras de pastoreo. La densidad poblacional de la cuenca del Río Uruguay es de aproximadamente 39 habitantes por kilómetro cuadrado (O'Farrell e Izaguerri, 2014).

La región de Salto Grande queda comprendida dentro del clima templado húmedo de llanura y una pequeña franja al noreste de clima cálido subtropical de llanura, sin estación seca. La temperatura media anual del clima templado es de 18,5°C. La franja cálida subtropical húmeda se caracteriza por inviernos suaves, con 13°C y con alto grado de humedad del aire 70%. En verano, la temperatura supera en promedio los 26°C. Esta región recibe los vientos procedentes del este, tanto los subtropicales (cálidos y húmedos) que provienen del noreste como el aire polar marítimo frío y húmedo proveniente del sureste.

Diferentes estudios argentinos y uruguayos se han centrado en el embalse de Salto Grande. El equipo de Bordet, Fontanarrosa y O'Farrell, (2017) observaron que las cianobacterias del CMA y del género *Dolichospermum* (CMA > Dolico) mostraron la distribución más heterogénea en los perfiles de profundidad durante los eventos de estratificación térmica, que no hubo eventos de floraciones cuando las descargas excedían de 10,000 m³/s y que las concentraciones más altas de microcistinas estuvieron asociadas a situaciones de alta turbidez después de los eventos de floración. Del mismo modo, O'Farrell e Izaguirre (2014) también habían observado que las comunidades del fitoplancton estaban reguladas por dos factores principales: las descargas y la estacionalidad. Las mayores abundancias estuvieron asociadas a las estaciones con altas temperaturas y las menores a las altas descargas.

Muestreos

Las campañas de muestreos se desarrollaron entre julio del 2015 a enero del 2017 en el embalse de Salto Grande con el barco de la comisión técnico mixta del embalse de Salto Grande (CTM). Se realizaron 9 muestreos con una periodicidad aproximada de dos meses (jul, sept y nov 2015; feb, mar, may, sept y dic 2016 y ene 2017). Los muestreos se hicieron en cuatro estaciones: Itapebí (ITA), Cañada del Viejo Águila (CVA), Gualeguaycito (GUA) y Represa Central (RPC) (Fig. 17) en las seis primeras campañas y solo en ITA y GUA en las tres últimas campañas. ITA y GUA se sitúan en los brazos del río Uruguay. RPC se localiza cerca de las compuertas de la represa y fue el sitio más profundo, entre 28 y 30m. Por último, CVA se sitúa al norte de GUA, tiene poca profundidad (oscila entre 1,5 y 3m) y es el sitio con la concentración de cianobacterias más elevada. Las campañas se realizaron en el barco de la comisión técnico mixta de salto grande (CTM). Se consideró floración como la multiplicación y acumulación de estos organismos en el cuerpo de agua de tal manera que cubrían completamente la superficie del agua y adquiriría un color verdoso, mientras que se consideran colonias visibles cuando se pudieron observar colonias a simple vista pero el color natural del agua se seguía distinguiendo (Fig. 18).

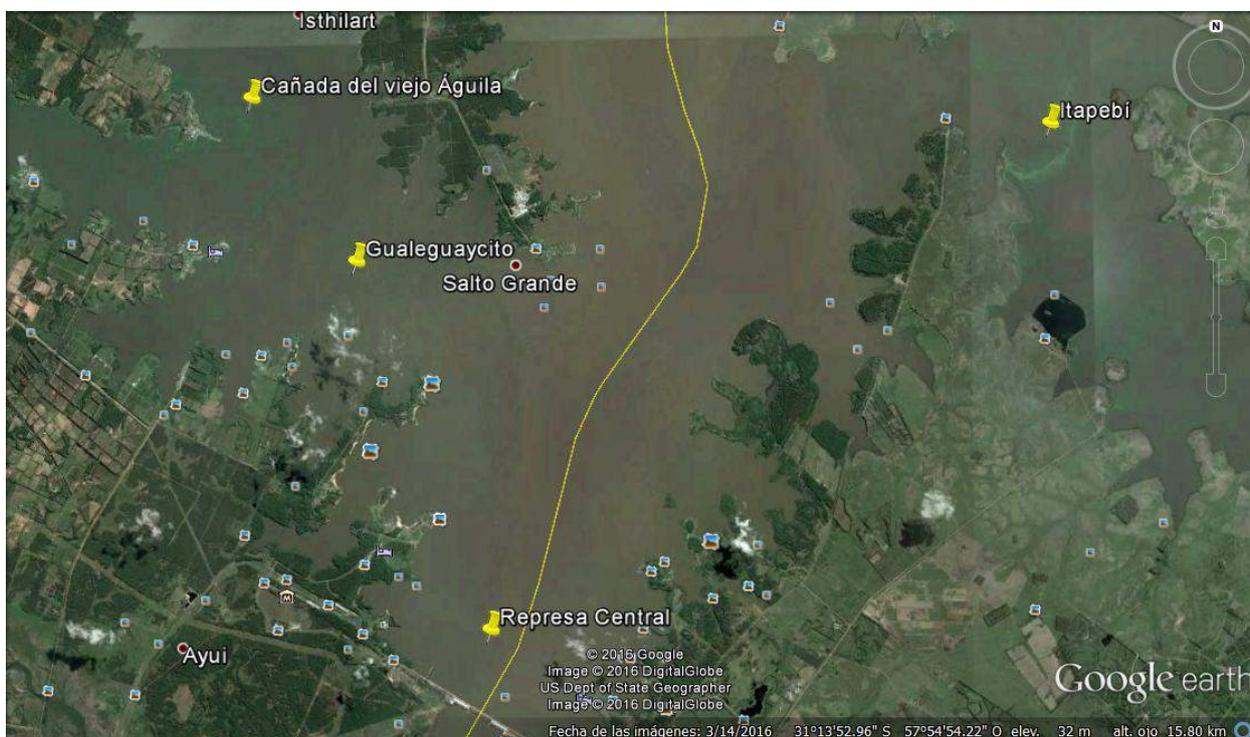


Fig. 17. Zoom del embalse de Salto grande mediante una foto aérea del embalse donde se marcan con chinchetas amarillas las cuatro estaciones de muestreo.

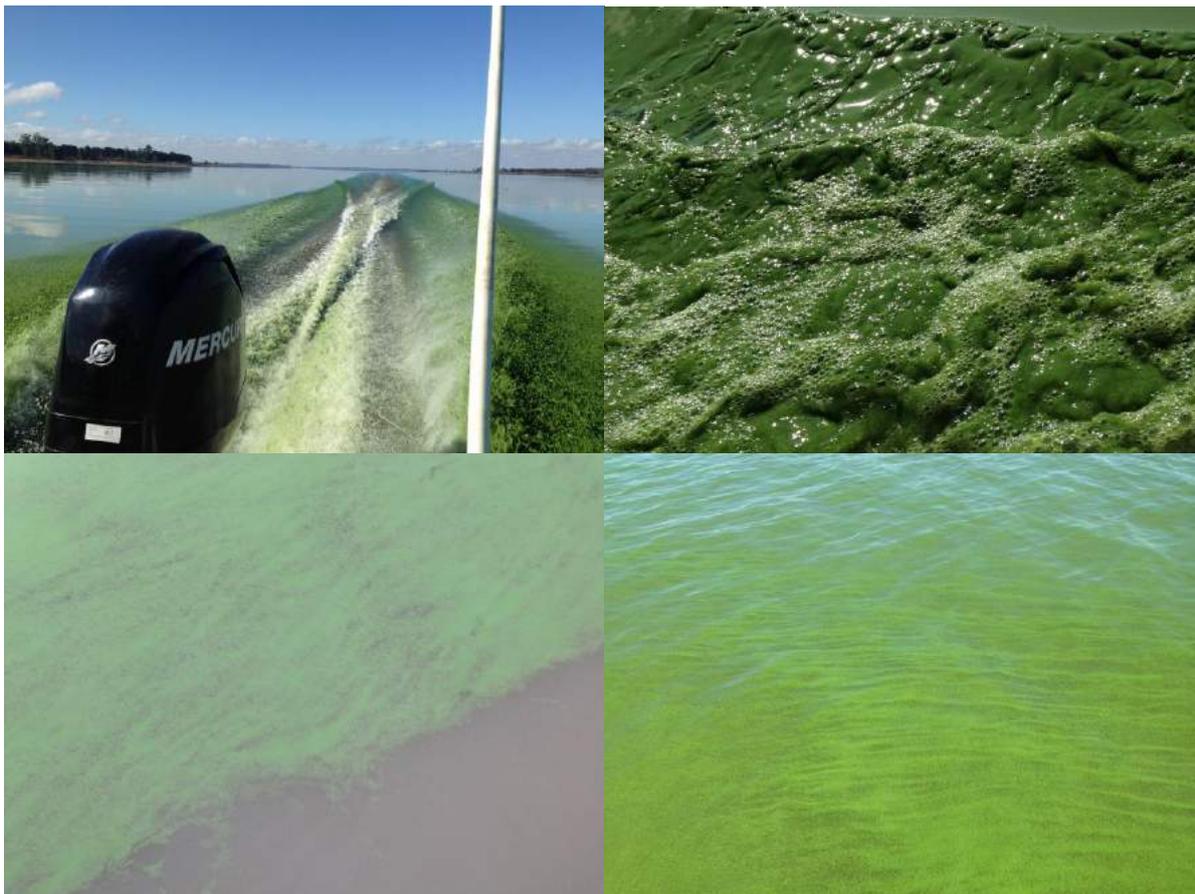


Fig. 18. Diferentes eventos de floraciones en el embalse de Salto Grande. De arriba abajo y de izquierda a derecha son: dos fotos de julio 2015, septiembre 2015 y marzo 2016.

La estrategia general de la tesis (Fig. 19) en cada sitio de muestreo se midieron variables meteorológicas in situ: viento (ms), humedad (%) y temperatura (°C,) en el aire con un anemómetro de campo. Como no se pudieron tomar los valores del viento en todos los muestreos se agregó otra variable que se llamó Viento_Inia ya que se sacaron los valores del viento de la página del INIA en los días muestreados. Variables químicas y biológicas: ph, temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/l), el disco de Secchi, la profundidad y la clorofila y la ficocianina (UFR) con el Hidrolab DS5 CTD. Se tomó el set de fotos con la aplicación del móvil por triplicado (que se describirá en el siguiente capítulo) y se tomaron 10L de muestra de agua sub-superficial. Esta muestra de agua se filtró en el laboratorio de la CTM para el fraccionamiento de las colonias, pero entre 250 y 300 ml de la muestra total fueron filtrados para la extracción de ADN total. Las muestras de las fracciones se fijaron para el conteo de microscopio y se congelaron para la extracción de ADN y posterior qPCR. Además, en el laboratorio de la CTM se analizó la turbidez (NTU) mediante el Standard Methods 2130 A y Clorofila-a ($\mu\text{g/l}$) mediante Standard Methods 10200 H ambos de American Public Health Association 22nd Ed. (2012) (Fig. 19).

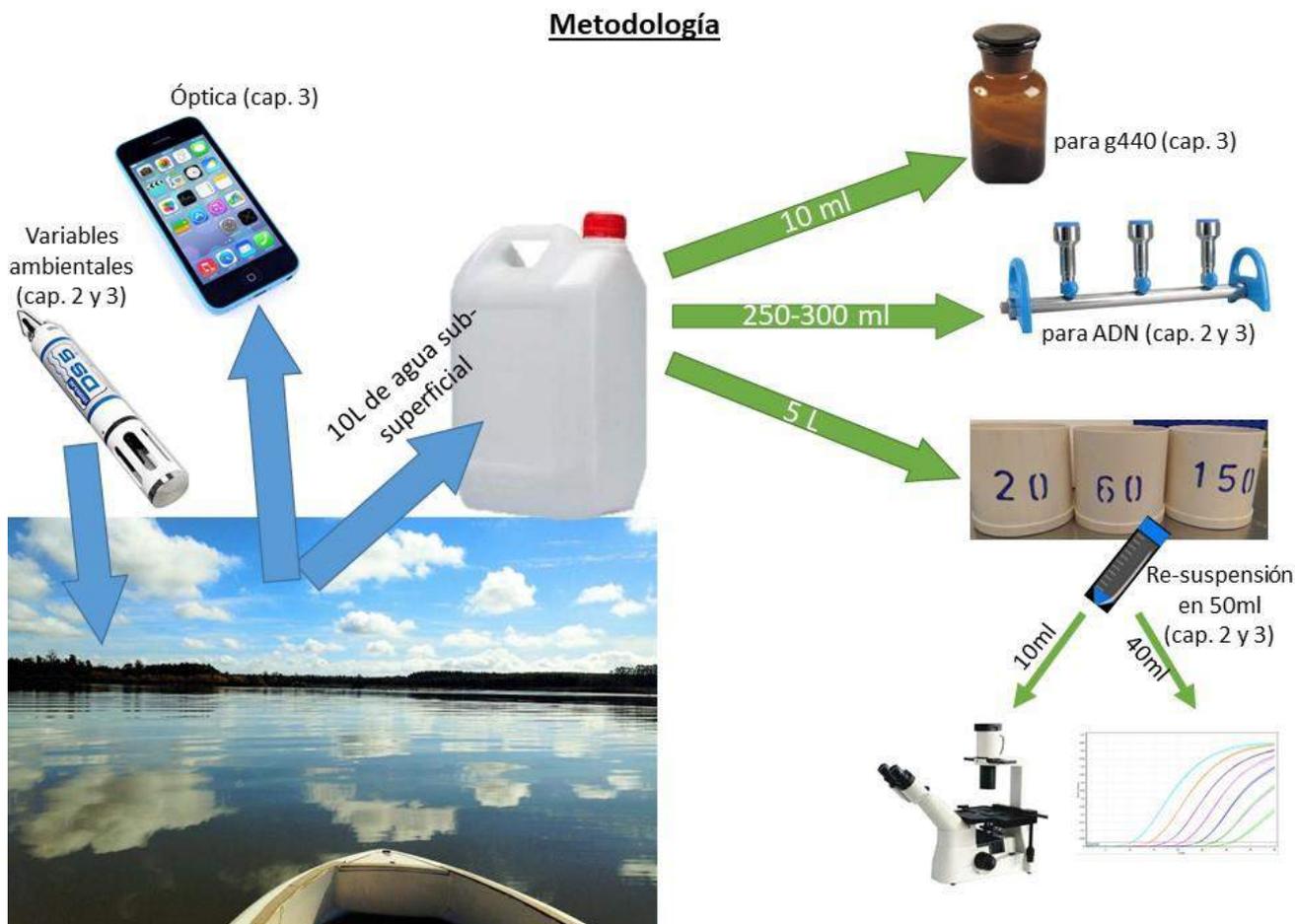


Fig. 19. Esquema de la metodología empleada para toda la tesis.

Conteo y cálculo del biovolumen de fitoplancton

Se tamizaron 5L de agua por tres copos con mallas de tamaños diferentes. En los casos en que hubo floración se tamizó solo 1L de agua. Se obtuvieron cuatro fracciones: menores a 20 μm (células individuales, C), entre 20 y 60 μm (pequeñas, P), entre 60 y 150 μm (medianas, M) y mayores a 150 μm (grandes, G) (Fig. 20). Las muestras para conteo se fijaron con solución formol al 4% y fueron almacenadas en tubos estériles.

Los organismos se contabilizaron y midieron en microscopio invertido Olympus IX81, el cual tiene integrada una cámara CCD de alta velocidad marca Olympus DP71 con el software Cell F para procesar las fotografías. Se realizaron conteos en cámaras Sedgewick-Rafter de 1 ml. Se evaluaron bandas y se contaron un máximo de 100 colonias del complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) o hasta analizar cuatro cámaras completas cuando la abundancia no alcanzó las 100 colonias.

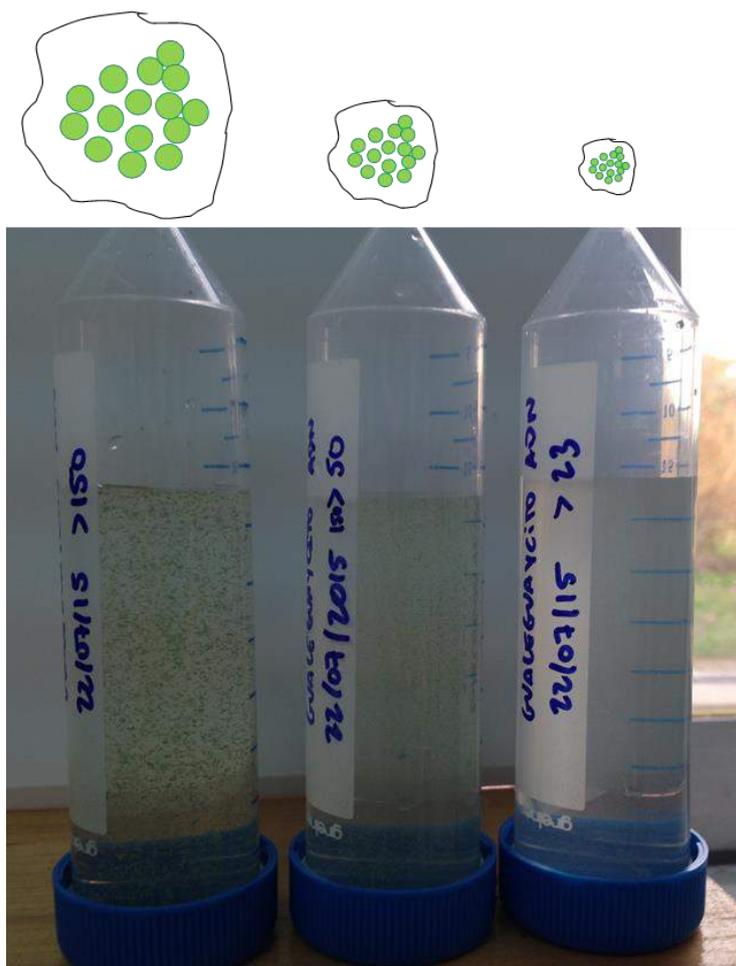


Fig. 20. Fotos de la división de las fracciones en los tubos falcon donde se ve a simple vista una distinción de tamaños.

Se registraron las dimensiones correspondientes al largo (A), ancho (B) y profundidad (C), en μm , con el software mencionado. La medida de profundidad se realizó moviendo el tornillo micrométrico del microscopio desde la primera célula visible hasta la última célula visible. Con las tres medidas se calcularon el volumen (μm^3) y la superficie individual (μm^2) donde se utilizó la forma de esferoide prolado como la aproximación geométrica más adecuada (Hillebrand et al., 1999; Alcántara, 2015). Además se consideró la dimensión lineal máxima (MLD, μm) como rasgo de la morfología individual. También se estimó el biovolumen (Bv), como indicador de la biomasa fresca, donde se multiplicó la abundancia por el volumen específico de los organismos ($\mu\text{m}^3/\text{ml}$).

Extracción de ADN

Se filtró entre 200 y 300 ml de la muestra entera, sin fraccionar, y del agua recogida después del tamizado (muestra $<20\ \mu\text{m}$) por filtros de celulosa de $0.45\ \mu\text{m}$. Las muestras tamizadas en los falcon con las fracciones se congelaron al llegar al laboratorio y antes de comenzar la extracción se filtraron alrededor de 15 ml por filtros de celulosa de $0.2\ \mu\text{m}$ (Fig. 21). Se utilizó el protocolo de extracción de ADN adaptado en el Departamento de Microbiología del IIBCE (Martínez de la Escalera et al., 2017) con modificaciones y se ajustaron las condiciones para cada muestra. La rotura de las células se hizo mediante micro tubos de 2ml donde se introdujeron perlas de cerámica y se agitaron a 6m/s durante 40s en un instrumento de mesa homogeneizador de alta velocidad de la marca *fastprep*.



Fig. 21. La foto de la izquierda muestra el filtro de la fracción mayor a $150\ \mu\text{m}$ en un período de floración. La foto de la derecha muestra la distinción de colores acorde al tamaño de las fracciones luego de la lisis celular para realizar la extracción del ADN.

Cuantificación de genotipos tóxicos del CMA

El PCR en tiempo real se ajustó utilizando *primers* específicos previamente diseñados (Tabla 3). Para las reacciones se mezcló un volumen final de reacción de $20\ \mu\text{l}$ de: $9,5\ \mu\text{l}$ de agua, $0,5\ \mu\text{l}$ de BSA (30mg ml^{-1}), $7,76\ \mu\text{l}$ de mezcla (Power SYBR Green PCR), $0,12\ \mu\text{l}$ de cada primer ($50\ \mu\text{M}$) y $2\ \mu\text{l}$ de ADN de la muestra. El termociclador utilizado para los ensayos de qPCR fue Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO RAD) y las condiciones de ciclado fueron 2 min a 50°C , 15 min a 95°C y 40 ciclos de 15 seg a 94°C , 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C . Al final se dibujó la curva de *melting* desde 65°C a 95°C , en incrementos de 1°C cada 4 sec. para confirmar la especificidad del fragmento amplificado. La curva de calibración se realizó como se describió en el capítulo 2.1. (Martínez de la Escalera et al., 2017).

Para comprobar la fiabilidad del procedimiento de tamizado, la sumatoria de la abundancia de *mcyE* en las cuatro fracciones se correlacionó contra la abundancia total obtenida de la muestra sin tamizar. Se obtuvo una correlación estadísticamente positiva ($\rho=0.69$ y $p\text{-value}<0.05$) que confirmó un procedimiento del tamizado correcto (Fig. 22).

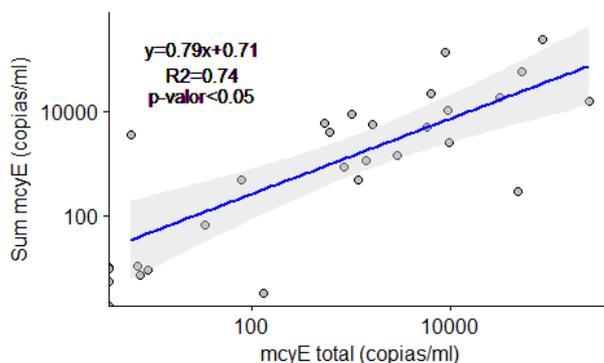


Fig. 22. Correlación entre el número de copias/ml obtenido del filtro de la muestra total contra el sumatorio de las abundancias obtenidas en las distintas fracciones. Ambos ejes están en logaritmo.

Análisis genéticos y de la concentración de microcistinas

Las muestras provenientes de GUA e ITA en diciembre 2016 y enero 2017 se emplearon para realizar análisis genéticos para cuantificar el ARNm (qPCR), para analizar la diversidad de genotipos tóxicos (HRMA) y para cuantificar la concentración de microcistinas (ELISA). Además para comparar con un periodo estacional diferente se realizó la técnica del HRMA en las muestras de GUA, ITA, CVA y RPC en septiembre del 2015.

- **Cuantificación del ARNm mediante la técnica de qPCR**

Entre 250 y 300 ml de la muestra de agua se filtró y estos filtros fueron conservados en ARNlater hasta su posterior análisis. Para la extracción de ARN se utilizó el Kit PureLink™/ RNA MiniKit y se obtuvo el ADN copia que se cuantificó por la técnica del qPCR como fue descrito anteriormente.

- **Análisis de microcistinas por el método ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ‘Ensayo por Inmuno Absorción Ligado a Enzimas’)**

El ensayo de ELISA se realizó en el instituto de Higiene de la UDELAR con la supervisión de la Dra. Beatriz Brena de acuerdo a Pirez et al. (2013). El mecanismo del ELISA consistió en agregar la muestra en una placa multi-pocillos unida con un conjugado microcistina-Seroalbúmina. A continuación, se adicionó el anticuerpo y por último el sustrato, el cual genera color en presencia del conjugado. Por último, se midió la absorbancia a 450 nm. Las muestras se expresaron en $\mu\text{g/L}$ con un límite de detección de 0.2 $\mu\text{g/L}$.

- **Análisis de diversidad de genotipos tóxicos por la técnica de HRMA (High Resolution Melting Analyses)**

Para esta técnica se usó el gen *mcyJ* (Tabla 7) basado en las evidencias que muestran que es el gen más conservado del cluster *mcy* (Tabane et al., 2004, 2009). Para la amplificación se usó un 96 FLX Touch TM thermal cycler (Bio-Rad). Se aplicaron dos µl del extracto de ADN de cada muestra al Mix de MeltDoctor HRM Master, lo que resultó en un volumen final de 20 µL. Las condiciones de ciclado fueron 2 min a 50 °C, 15 min a 95 °C and 40 ciclos de 15s a 94 °C, 30s a 60 °C y 30 s a 72 °C. Los perfiles de melting de los amplicones resultantes se ejecutaron de 65 °C a 95 °C con un incremento de 0,02 °C/s. Los datos del HRMA se obtuvieron y analizaron usando el Bio-Rad Precision Melt Analysis (Bio-Rad). Cada muestra se corrió por triplicado. El análisis se desarrolló a unas temperaturas de melting entre 77.2 y 81.2.

Tabla 7. *Primers empleados para amplificar el gen mcyJ, involucrado en la síntesis de microcistinas, mediante qPCR en tiempo real.*

Objetivo del gen	Nombre del primer	Secuencia	Referencias
<i>mcyJ-Microcystis spp.</i>	<i>mcyJ_F</i>	TAGCTAAAGCAGGGTTATCG	Kim et al., 2010
	<i>mcyJ_R</i>	TCTTACTATTAACCCGCAGC	

Análisis de los datos

Se midieron un total de 5606 colonias provenientes de 9 muestreos. El volumen tamizado siempre estuvo contemplado en las fórmulas. Los gráficos de boxplot, plots, barras e histogramas se realizaron con el paquete *ggpubr* y en los análisis estadísticos siempre se establecieron valores de $p \leq 0,05$ como significativos. En los boxplots siempre se estableció que el suelo y el techo de la caja representan los cuartiles 25% y 75% respectivamente y la línea cerca del centro representa el percentile 50 (mediana). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa libre R, versión 3.4.0 (R Core Team, 2017) y para los gráficos se usó el paquete *ggpubr* (Kassambara, 2016).

Para evaluar la relación entre las distintas variables ambientales se utilizó una matriz de correlación mediante la función *pairs* (Becker, Chambers y Wilks, 1988). Para explorar estas variables en los distintos puntos de muestreo y reducir la dimensionalidad del conjunto de datos se analizaron los componentes principales (PCA).

Para evaluar la relación entre las distintas variables fisicoquímicas, el tamaño o la toxicidad con los indicadores biológicos se empleó un enfoque de tipo correlativo. El tipo de correlación empleada fue el test de correlación no paramétrico de Spearman (R^2) el cual se definió en función de la estructura de los datos. Para determinar diferencias entre las variables analizadas, se aplicó los análisis no paramétricos de Kruskal- Wallis para varios grupos de datos y el de Wilcoxon para comparar la medida de dos grupos independientes. En el análisis de las microcistinas se usó la aproximación de mixed models mediante el paquete de nlme y se evaluó las diferencias significativas entre grupos en la varianza y en la media.

Los modelos lineales múltiples se generaron para evaluar la relación entre las variables ambientales y la abundancia de genotipos tóxicos. Las variables explicativas fueron las variables ambientales (viento, temperatura del agua y conductividad) y/o el biovolumen total y de las fracciones. Cuando el modelo lineal no cumplió con los supuestos se aplicó un modelo lineal múltiple generalizado (GLM), con familia gamma y función log *link*. El mejor modelo se calculó mediante la selección *backward* y se comparó basándose en el criterio de Akaike (AIC) (Burnham and Anderson, 2002). Para calcular el pseudo R^2 del GLM se calculó mediante la función Nagelkerke R2 (R Core team, 2017).

La diversidad de genes *mcyJ* en las muestras estudiadas por este método se evaluó mediante análisis de clusters. Los clusters se calcularon mediante la función *hclust* y por el método euclidiano. Las matrices se traspusieron centradas y escaladas. Los datos del HRMA se analizaron mediante un CART con la función *rpart* (Breiman, Friedman, Olshen and Stone, 1984).

En el árbol de regresión, la variable respuesta fueron las temperaturas de las curvas de *melting* de los resultados obtenidos del análisis del HRMA. Estos datos se usaron como datos funcionales y se realizó un CART multivariado (Martinez de la Escalera et al., en revisión). Como variables explicativas se establecieron: *mcyE*, *mcyE/Bv*, *cADN/ADN*, *MLD*, *Volumen*, *Área*, *Bv* y la abundancia. Para evaluar el error en el modelo se calculó como el error medio de un *loop* de 100 validaciones cruzadas donde 1/3 de los datos fueron usados para la muestra de prueba y 2/3 para la muestra de entrenamiento. Se consideró el árbol óptimo como aquel que minimiza el error predictivo del modelo sobre unos datos externos utilizados para su validación. Para realizar este proceso de parada de forma automatizada se procede de la siguiente manera: se construye un árbol tan complejo como sea posible y se realiza una poda hacia atrás de las particiones que no representen un aumento

considerable de la predicción total. Para ello se utiliza un parámetro alfa llamado «parámetro de complejidad» (cp) (Calle y Sánchez-Espigares, 2007). En nuestro caso se estableció un $cp=0.00001$ y se pudo hasta obtener el cp máximo que correspondió con el valor del cp del árbol que tuvo el menor error en la muestra de entrenamiento, el cual se calculó mediante la suma del cuadrado de la diferencia entre valores observados y predichos.

2.2.3. Resultados

Caracterización ambiental

La profundidad de los diferentes puntos de muestreo estuvo comprendida entre 1 y 30 metros, pero en cada sitio la profundidad osciló entre 1 y 2 metros de diferencia a lo largo de los 18 meses de muestreo. Se observó un rango en la temperatura superficial del agua desde 15 a 29 °C y estuvo linealmente relacionada con la temperatura del aire ($T_{\text{agua}} (^{\circ}\text{C}) = 6.06 + 0.75 T_{\text{aire}}$; $R^2 = 0.91$). El viento varió en los sitios de muestreo entre momentos sin viento (0 km/h) y viento de 15 km/h. La mayor intensidad del viento se observó en verano austral y tuvo una relación positiva con la temperatura del aire ($r_s = 0.71$, $p < 0.05$) y del agua ($r_s = 0.78$, $p < 0.05$).

La turbidez varió entre 17 y 117 NTU, también dependiendo del sitio de muestreo. El valor de turbidez más alto (117NTU) se obtuvo en RPC en julio debido a un gran aporte de materia orgánica que le confiere al río el color rojizo. En ese mes, en RPC no se encontraron colonias de cianobacterias ni a simple vista ni en el microscopio. La conductividad no tuvo altas variaciones, se mantuvo entre 40 y 66 ($\mu\text{s}/\text{cm}$) durante todas las campañas de muestreo. El oxígeno disuelto osciló entre 6.34 y 12.43 mg/l, los valores más altos se encontraron en marzo del 2016 y en enero de 2017 cuando había altas concentraciones de cianobacterias que producían oxígeno. Por último, el pH osciló entre 5,69 y 9,97, valores dentro de un pH neutro - básico; lo que proporciona un ambiente propicio para el crecimiento del CMA.

En la figura 23 se puede ver la presencia de floraciones en las distintas campañas de muestreo acorde a la temperatura. Se puede observar que en CVA hubo floraciones en 5 de las seis campañas y en ITA y RPC nunca se presenciaron floraciones. Además, en la tabla 8 se muestran las correlaciones significativas encontradas entre las variables.

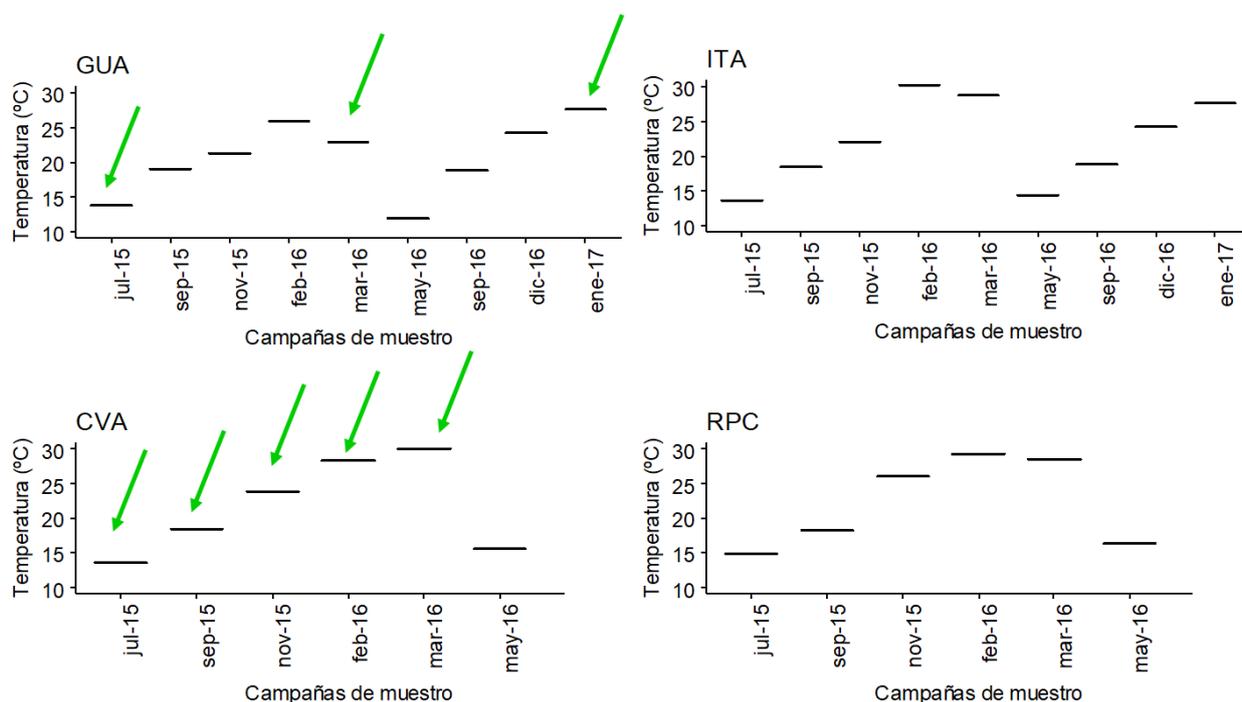


Fig. 23. Campañas de muestreo frente a la temperatura en los cuatro sitios muestreados, las flechas verdes marcan los eventos de presencia de floraciones.

Tabla 8. Correlaciones estadísticamente significativas entre las variables ambientales para p-valor 0.05 y p-valor 0.1.

	V.int	Hume	Taire	Z	Tagua	pH	K	Turb	O2	Sechii	Cl.a	Fluor Cl.a	Fluor. Fico
V.int			0.62		0.80	-0.47			-0.66	0.74			
Humedad			-0.81		-0.70								
Taire	0.62	-0.81			0.84					0.60			
Z						-0.50			-0.61		-0.45		
Tagua	0.80	-0.70	0.84							0.64	0.50		0.55
pH	-0.47			-0.50				0.79	0.90	-0.56	0.51		0.49
K										-0.49			
Turb						0.79			0.80	-0.67	0.49		
O2	-0.66			-0.61		0.90		0.80		-0.72			
Sechii	0.74		0.60		0.64	-0.56	-0.49	-0.67	-0.72				
Cl.a				-0.45	0.50	0.51		0.49					0.84
Fluor.Cl.a													
Fluor.Fico					0.55	0.49					0.84		

La relación entre las variables ambientales y las estaciones de muestreo se estudió mediante el análisis de componentes principales. Con ambos componentes se distinguieron las variables ambientales que mostraron una variabilidad temporal. El resultado mostró que en el componente 1 las variables temperatura y viento dividieron las campañas de muestreo según las estaciones climáticas, y la componente 2 marcó con la profundidad una distribución por sitios de muestreo, GUA y CVA de un lado y RPC e ITA del otro lado; lo que coincide con los sitios donde hubo más y menos floraciones. Además, ITA y RPC siempre fueron las estaciones más profundas por eso se correlacionan con la profundidad, variable que es inversamente proporcional al pH (como también se vio en la matriz de correlación). Por último, la temperatura y el viento se relacionaron más con los meses de verano y la conductividad con los meses de invierno (Fig. 24).

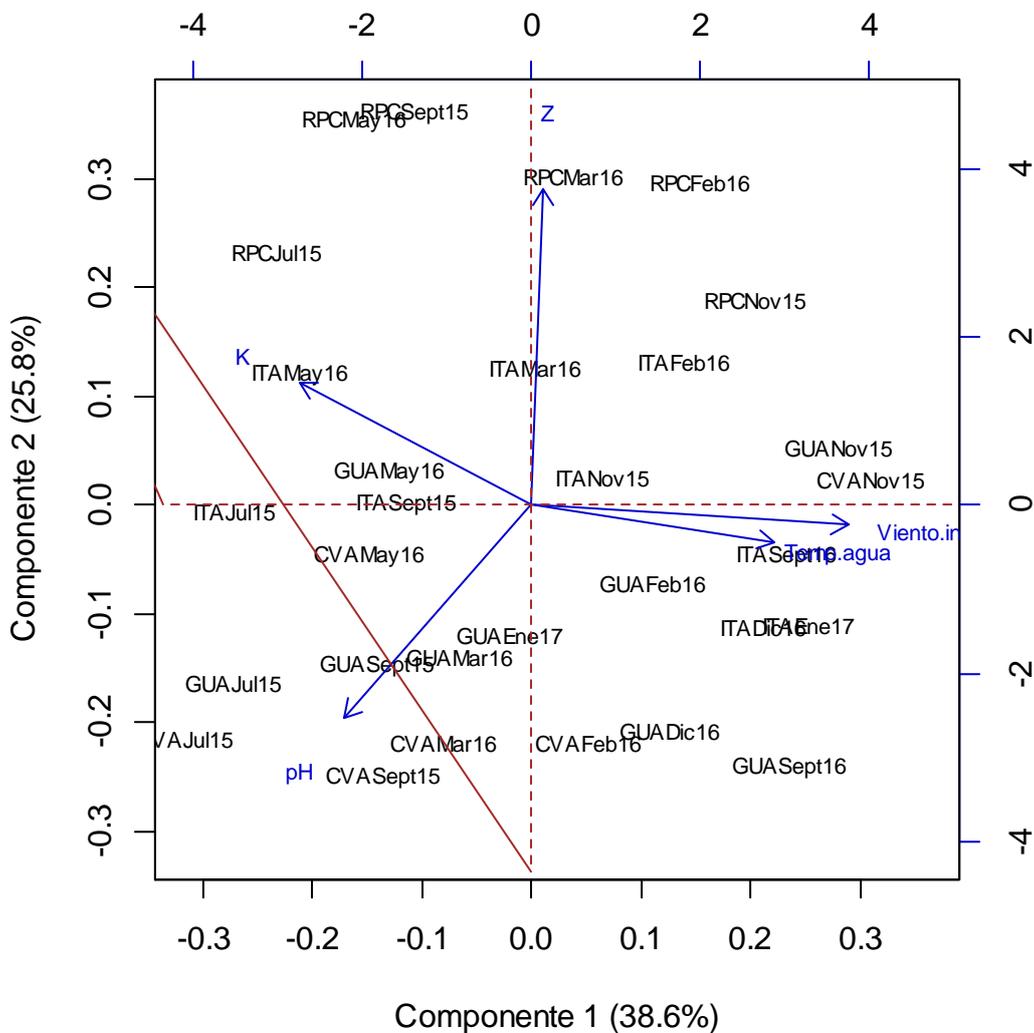


Fig. 24. Análisis de componentes principales (PCA) entre las estaciones de muestreo, identificados con las siglas seguido del mes y las variables ambientales temperatura del agua, viento (datos sacados del INIA), profundidad, conductividad y pH. Los datos se escalaron y centraron y se usó la función princomp y biplot. La rayas punteadas son los ejes marcados por el componente 1 y el componente 2. Se evitó representar variables que estuvieran correlacionadas entre sí.

Cuando se analizó la dirección de los vientos en todas las campañas de muestreo, se observó que los vientos más intensos fueron los que provenían del NE y esto coincidió con vientos más cálidos y con valores altos de Cl-a, indicador de la presencia de fitoplancton (Fig.25).

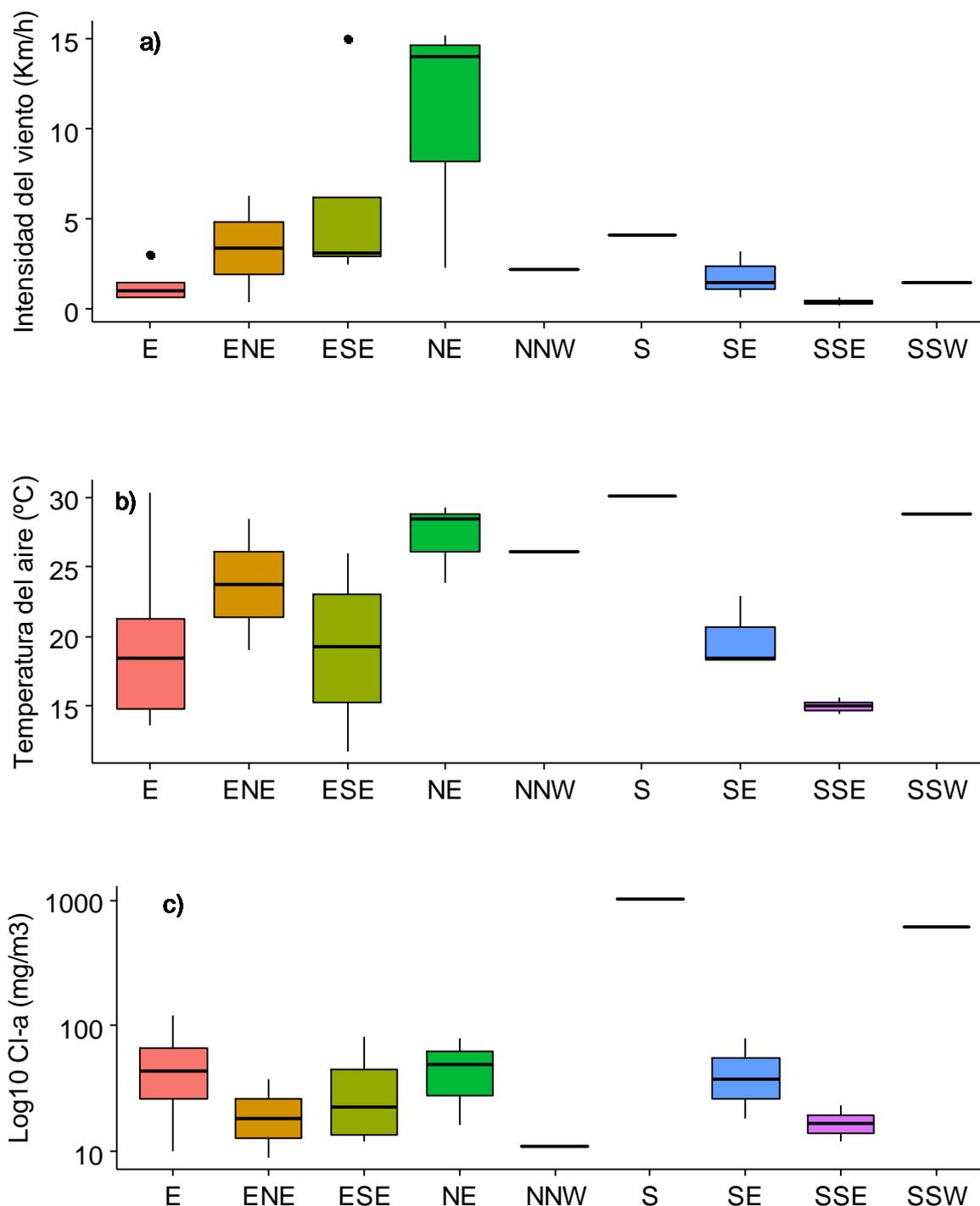


Fig. 25. Boxplots con la dirección del viento en el eje X y en el Y: la intensidad del viento (a), temperatura (b), Cl-a (c). Se usaron todos los datos de todas las campañas de muestreo (n=30) y las cajas representan el percentil 25 y 75%, con la media marcada por una línea.

Estudio de la morfología en las comunidades del CMA

El valor de biovolumen del CMA se registró como cero en aquellos meses que no se pudo identificar ninguna colonia ni floración ni a simple vista ni en el microscopio ya que no se encontraron colonias o floraciones del CMA en todos los meses del año (Tabla 2).

El histograma de MLD indica una alta variabilidad de tamaños en todas las muestras analizadas. Las colonias mayores a 500 μm se encontraron con menor frecuencia en nuestras muestras (Fig. 26). Los valores de MLD oscilaron entre 5 y 1626.94 μm , donde se obtuvo un valor medio de 177 μm y 129 μm de mediana.

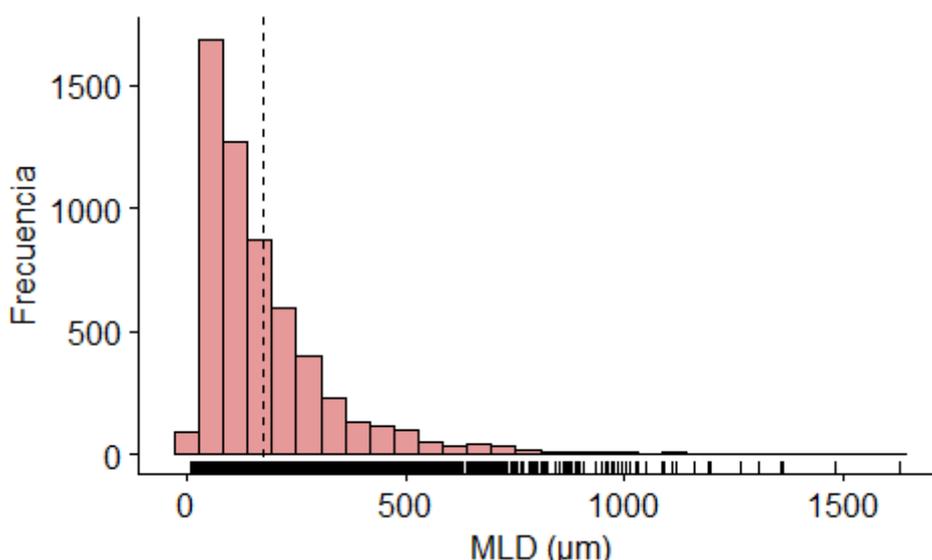


Fig. 26. Histograma de MLD según su frecuencia observada (cuantas veces apareció cada tamaño). Las colonias se encontraron en el rango de 5 a 2000 μm ($n=5706$). La línea punteada corresponde a la media de la MLD.

Cuando se analizó la MLD en las diferentes estaciones de muestreo se observaron diferencias significativas entre las diferentes estaciones y la variabilidad fue mayor en RPC (Fig. 27).

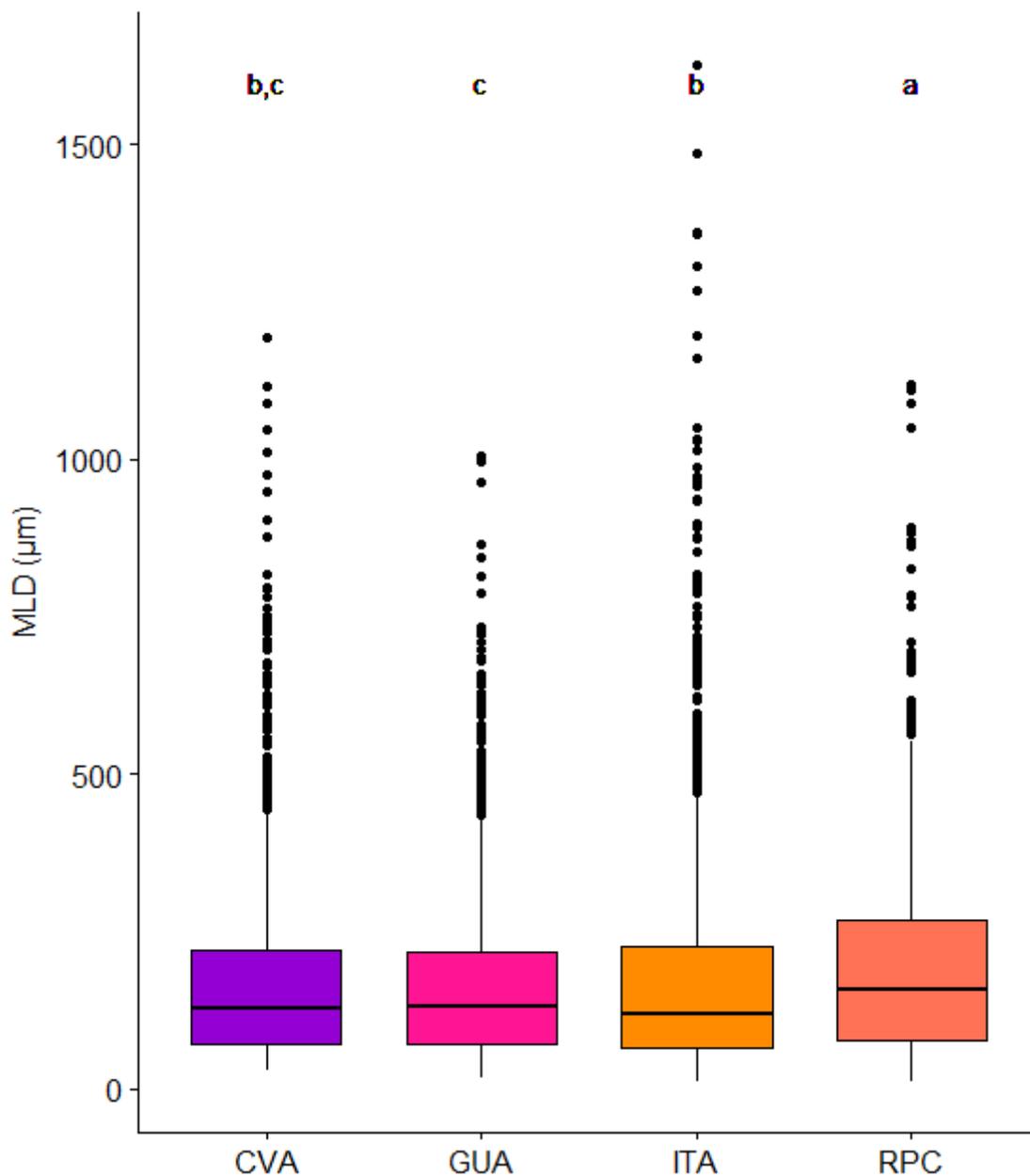


Fig. 27. Se muestran los datos de MLD agrupados en cada uno de las cuatro estaciones de muestreo. Las diferentes letras indican la diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$) ($n = 5706$).

La abundancia y la forma de las colonias variaron entre las diferentes épocas de año. En mayo 2016 se obtuvieron las menores abundancias (Tabla 2). La figura 28 toma como ejemplo la fracción mayor a 150 µm en GUA para poder ver las diferencias en la MLD y en su abundancia. Además el tamaño entre las diferentes fracciones se observó en el tamizado de las muestras y en el microscopio (Fig. 29).

Formas y tamaños del CMA en GUA a lo largo de 18 meses

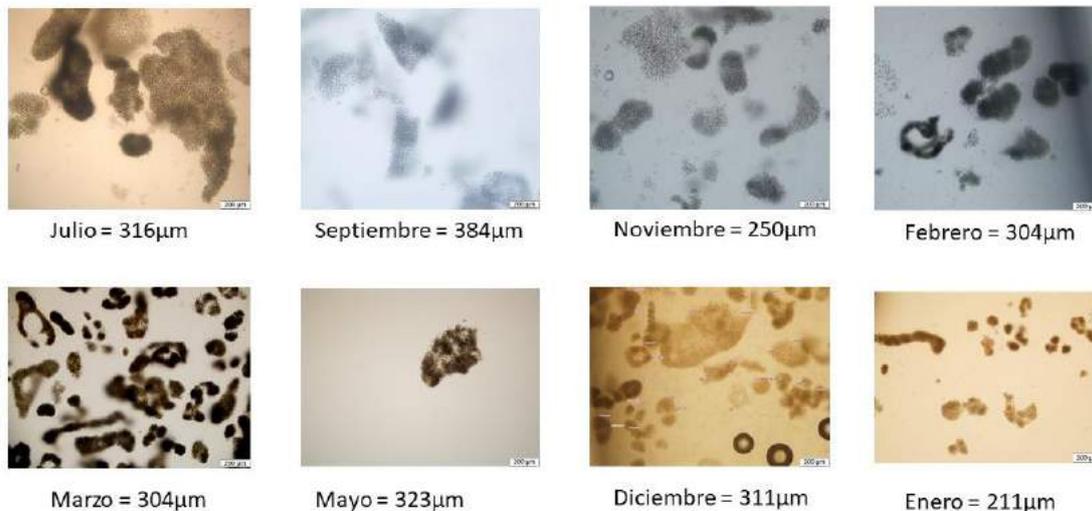


Fig. 28. Fotos de las muestras de agua tomadas en cada muestreo en donde se encontraron colonias en GUA. Se tomó como ejemplo la fracción mayor a 150µm. Se aprecia la diferencia en los tamaños (la escala corresponde a 200µm) y en la abundancia entre los meses. Los MLD señalados corresponden al promedio de MLD calculado en GUA en cada muestreo.

Fracciones coloniales del CMA en GUA



Fig. 29. Fotos de las tres fracciones coloniales donde se aprecia la diferencia de tamaños. Las tres fotos corresponden a un evento de floración, marzo 2016, en GUA. La escala corresponde a 200µm.

Al igual que en el capítulo 2.1., se estudiaron los rasgos específicos de las colonias del CMA acorde a su morfología y estrategia ecológica. Se analizó la MLD frente al volumen y a la relación superficie/volumen (Tabla 2). Se observó una relación positiva entre el volumen y la MLD, lo que indicó que el aumento del tamaño va acompañado de un aumento del volumen colonial (Fig. 30). Por otro lado, se obtuvo una relación negativa entre la MLD y la relación superficie/volumen (Fig. 31), ya que las colonias más grandes disminuyen su coeficiente superficie/volumen mediante el incremento del volumen pero reduciendo la superficie.

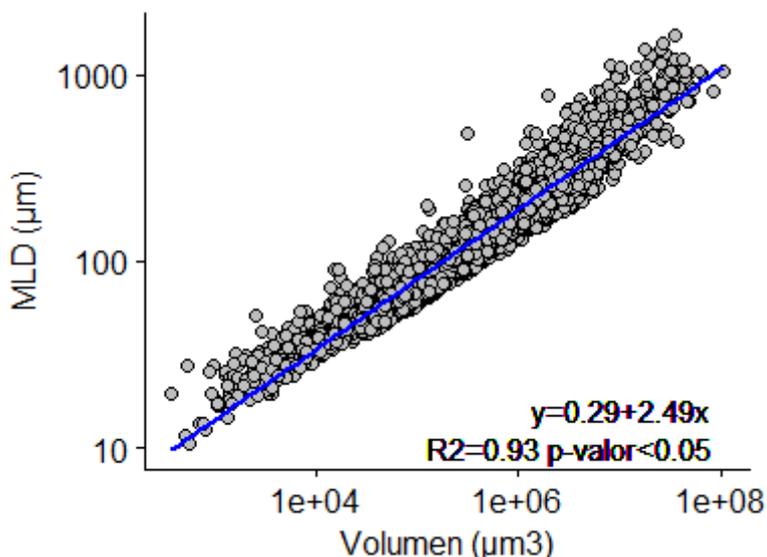


Fig. 30. Relación lineal entre la MLD y el volumen. Línea azul es la línea de tendencia del modelo. Ambos ejes están representados en logaritmo (n=5706).

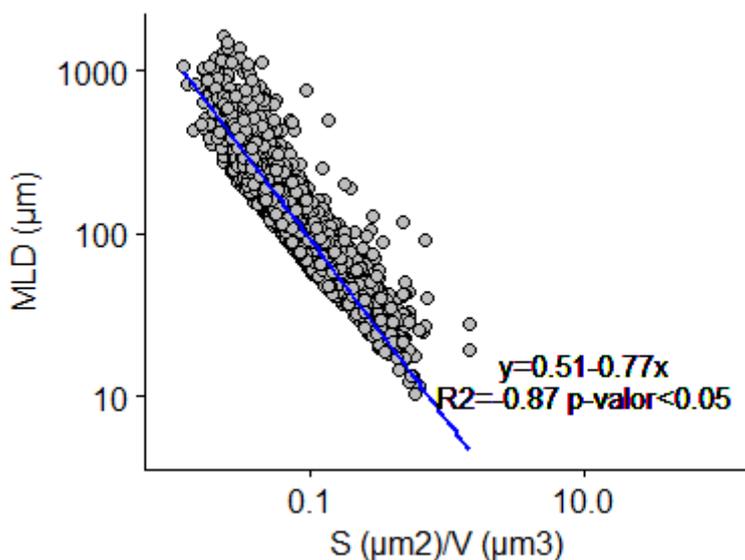


Fig. 31. Relación lineal entre la MLD y la relación S/V. Línea azul es la línea de tendencia del modelo. Ambos ejes están representados en logaritmo (n=5706).

Cuando se analizó la relación entre MLD y el Bv de la comunidad del CMA (Tabla 2) se observó una relación positiva y significativa entre ambas variables. La nube de puntos se diferenció por las estaciones de muestreo. El anova estableció que GUA es diferente significativamente todas las estaciones de muestreo y GUA se diferenció significativamente de RPC ($p < 0.05$). El resultado fue similar a lo observado por el PCA (Fig. 32). Para un mismo tamaño se alcanzaron mayores biomásas en CVA.

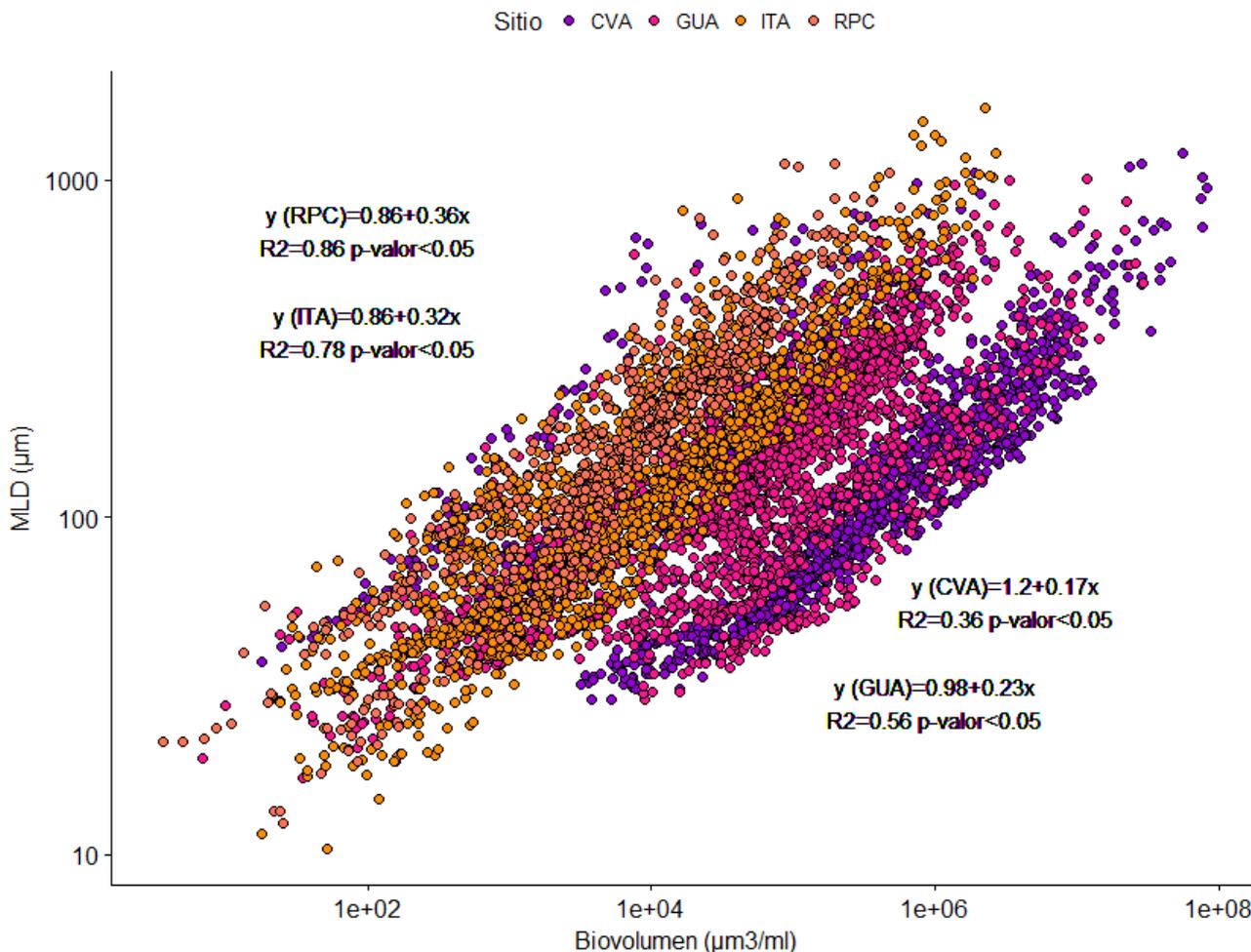


Fig. 32. Relación lineal entre la MLD y el biovolumen. Los diferentes colores representan las cuatro estaciones de muestreo. Los ejes están en logaritmo (n=5706).

Cuando se analizó la MLD frente a la presencia o ausencia de floraciones, no observaron diferencias significativas entre los tamaños, aunque hubo una variabilidad mayor en ausencia de floraciones (Fig. 33). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas del biovolumen desarrollado por el CMA cuando hubo floración frente al encontrado en ausencia de las mismas. Los resultados obtenidos del análisis del microscopio corresponden a lo observado mediante detección visual en los muestreos. (Fig. 34).

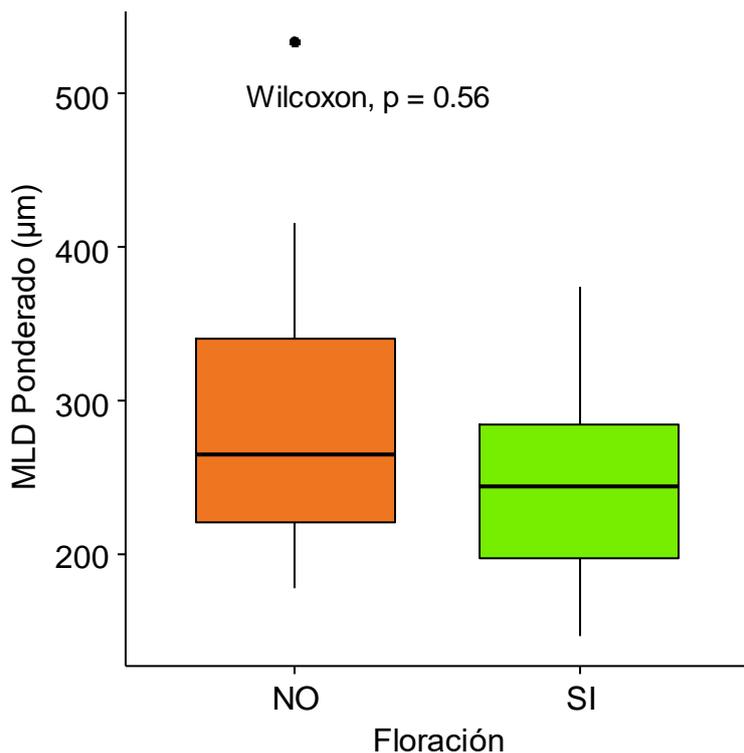


Fig. 33. Se muestran los valores de MLD ponderada en relación al biovolumen de acuerdo a la presencia o no de floraciones, según detección visual. MLD ponderado se calculó como: $(\sum \text{MLD fracción} * \text{Bv fracción}) / \text{Bv total}$ (n=30).

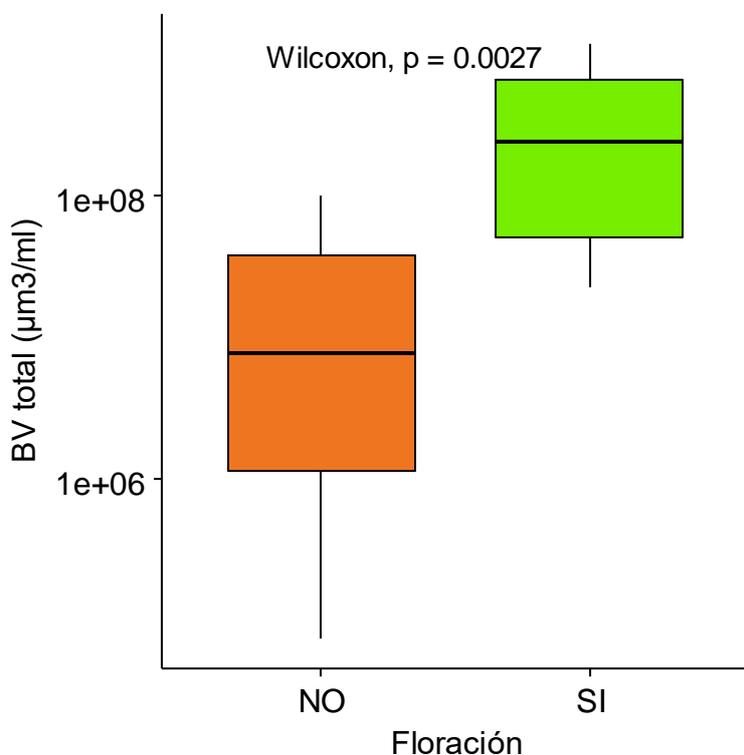


Fig. 34. Se muestran los valores de biovolumen frente a la presencia o no de floraciones descritas a simple vista (n=30).

Tampoco se observaron diferencias de tamaño entre los distintos periodos estacionales ($p > 0.05$). En invierno se encontró mayor variabilidad de tamaños que en verano, ya que coincidió con los períodos sin floraciones donde no ocurre una co-dominancia de especies (Fig. 35).

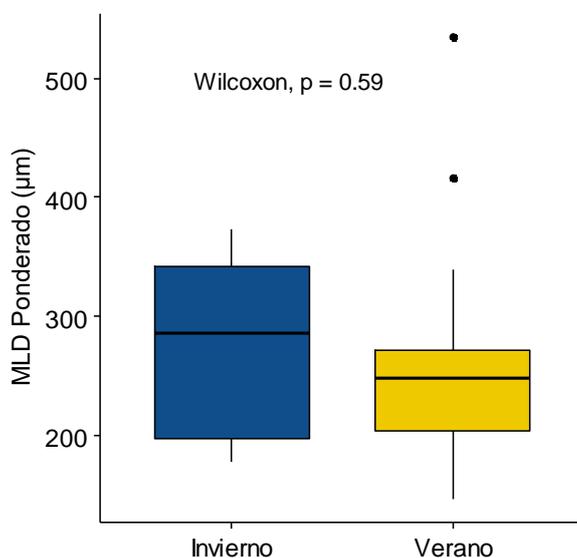


Fig. 35. Boxplot de los tamaños de MLD ponderado en invierno y en verano ($n=30$).

Cuando se estudió la relación entre las fracciones y las variables ambientales, se observó que el biovolumen de cada fracción se correlacionó con la temperatura del agua, la clorofila, la ficocianina y el biovolumen (Tabla 9). El biovolumen de cada fracción estuvo correlacionado con el biovolumen del resto de las fracciones.

Tabla 9. Correlaciones estadísticamente significativas para p -valor **0.05** y p -valor **0.1**.

	MLD Ponderado	Bv G	Bv M	Bv P	BV C	Bv total
Viento intensidad					0.75	
Profundidad			-0.52			
Temp agua		0.51	0.53	0.54	0.81	0.57
pH	-0.48		0.56			
Cl-a		0.83	0.88	0.94	0.52	0.86
Fluorescencia Cl-a						
Fluorescencia Ficocianina		0.76	0.83	0.85	0.64	0.80
MLD Ponderado						
Bv G			0.86	0.95	0.67	0.98
Bv M		0.86		0.91	0.59	0.97
Bv P		0.95	0.91		0.69	0.92
Bv C		0.67	0.59	0.69		0.70
Bv total						

En relación a la variación del biovolumen de cada fracción con respecto a la temperatura se observó una tendencia diferente entre las colonias y las células individuales. En las fracciones que presentaban colonias se alcanzó una temperatura óptima de 23-25 °C y a temperaturas más altas el biovolumen fue menor; mientras que las células individuales aumentaron de forma lineal con la temperatura (Fig. 36).

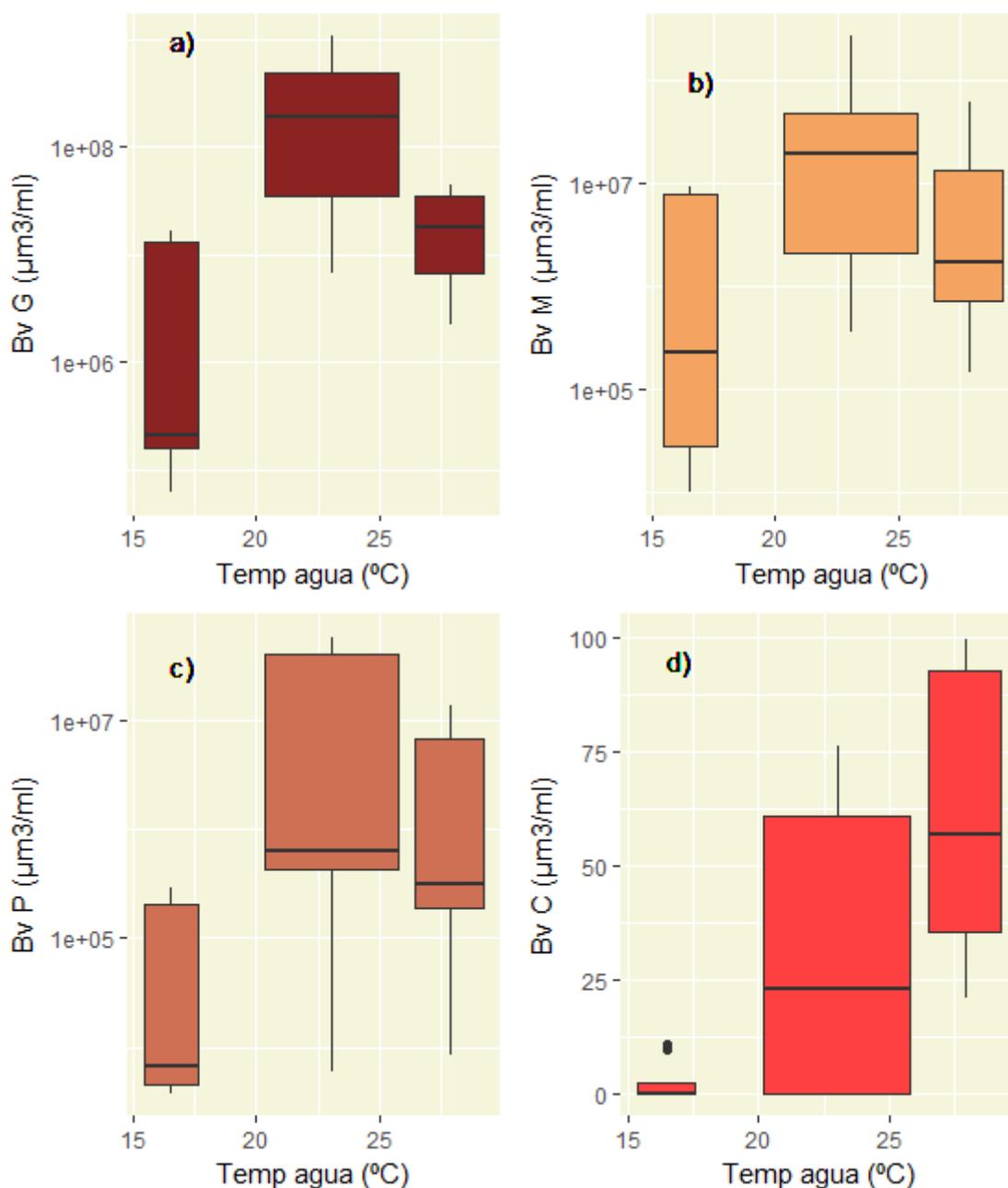


Fig. 36. Boxplot de las fracciones de tamaños frente a la temperatura en °C. (a) Fracción G ($>150 \mu\text{m}$), (b) fracción M (entre 150 y $60 \mu\text{m}$), (c) fracción P (entre 60 y $20 \mu\text{m}$) y (d) fracción C ($< 20 \mu\text{m}$). El eje Y está en logaritmo ($n=30$).

Potencial tóxico de las muestras

Al igual que en los análisis de MLD, los resultados de la abundancia de genotipos tóxicos en las diferentes estaciones de muestreo mostraron diferencias significativas. La mayor variabilidad en cuanto a esta variable se obtuvo en GUA y en CVA, donde siempre se encontraron células portadoras del gen *mcyE* y sus valores máximos fueron mayores que en ITA y RPC; en este último se registraron los menores biovolúmenes y nunca se registraron eventos de floraciones (Fig. 37).

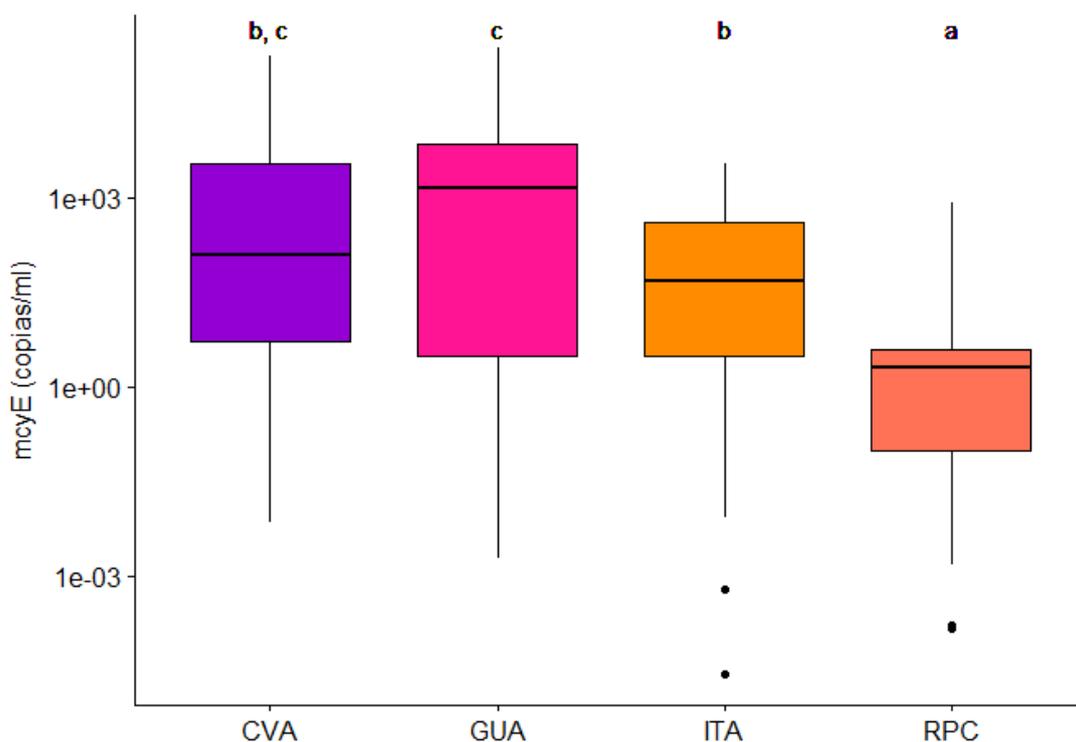


Fig. 37. Se muestran los datos de la abundancia del gen *mcyE* agrupados en las cuatro estaciones de muestreo. Las diferentes letras indican la diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$). El eje Y está en logaritmo ($n=30$).

Los mayores valores de la abundancia de genotipos tóxicos correspondieron a momentos dónde se registraron floraciones. Sin embargo, tampoco se obtuvieron diferencias significativas de la abundancia del gen entre verano y e invierno (Fig.38).

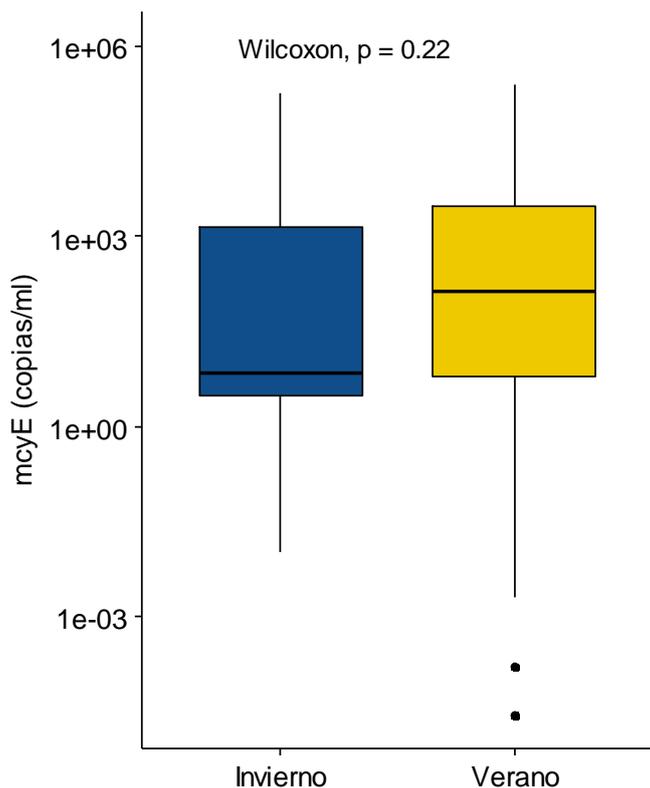


Fig. 38. Se muestran los datos de la abundancia del gen *mcyE* agrupados en invierno y verano. El eje Y está en logaritmo (n=30).

Potencial tóxico en relación al tamaño de los organismos del CMA

Se evaluó la relación entre la abundancia del gen *mcyE* y el biovolumen total de todos los muestreos se constató que existe una relación positiva y significativa (Tabla 2; Fig. 39).

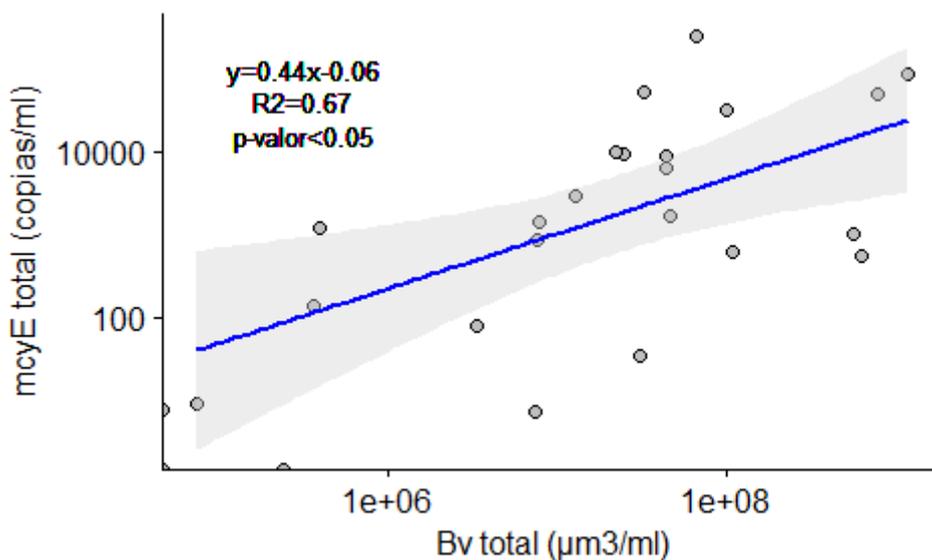


Fig. 39. Correlación entre el biovolumen total y la abundancia del gen *mcyE* total. Ambos ejes están en logaritmo (n=30).

Cuando se analizó la relación para cada fracción de tamaño definida. Estos resultados de la relación entre el biovolumen de cada fracción y la abundancia de genotipos tóxicos en esa fracción mostraron que también existe una relación positiva y significativa entre ambas variables. Todas las fracciones están relacionadas de manera lineal con su abundancia de genotipos tóxicos (Fig. 40).

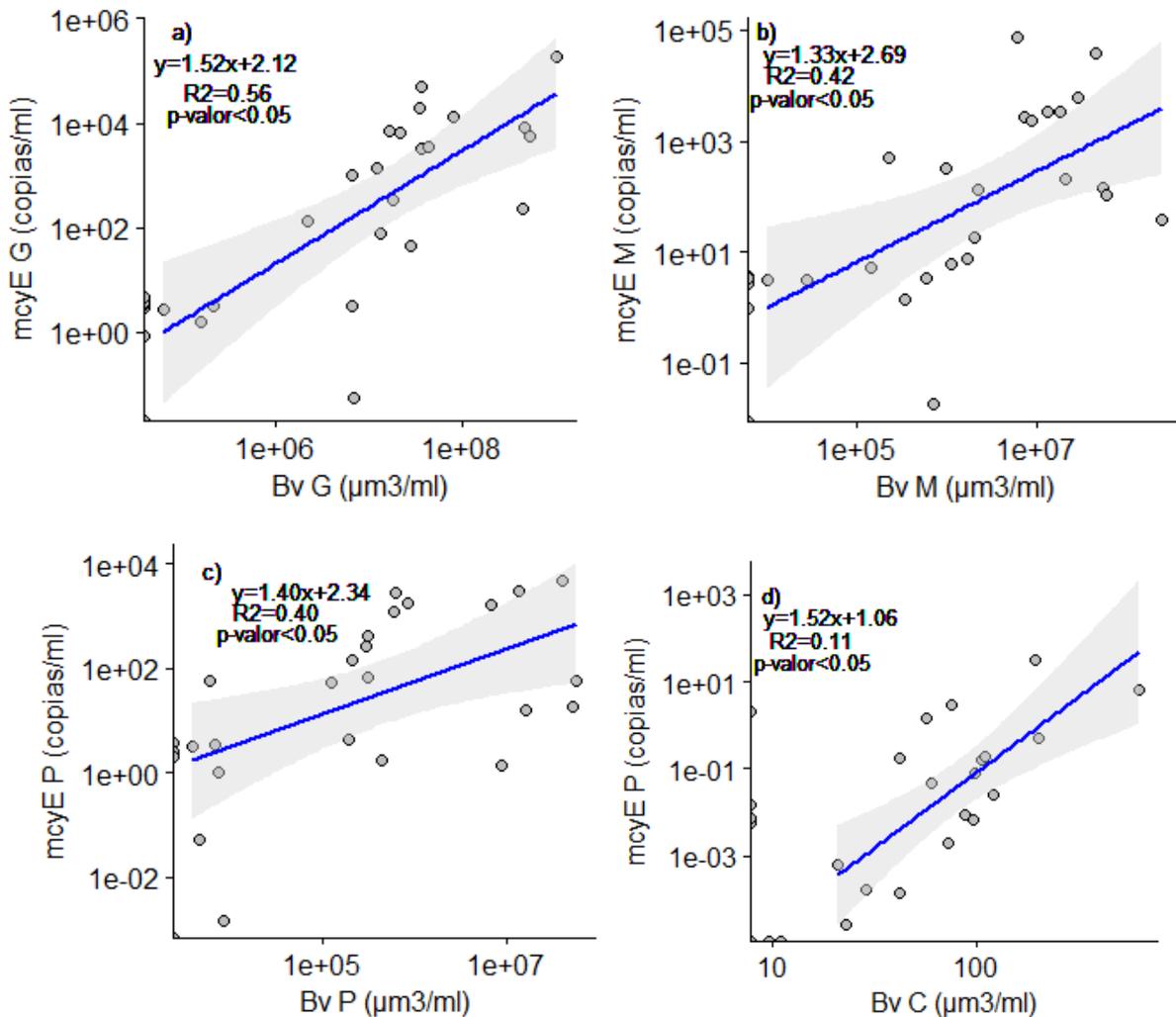


Fig. 40. Correlaciones entre el biovolumen de cada fracción y la abundancia del gen *mcyE* en esa fracción. (a) Fracción G (>150 μm), (b) fracción M (entre 150 y 60 μm), (c) fracción P (entre 60 y 20 μm) y (d) fracción C (< 20 μm). Línea azul es la línea de tendencia del modelo y la sombra gris el intervalo de confianza. Ambos ejes están en logaritmo (n=30).

A continuación se realizó el análisis de la abundancia de genotipos tóxicos en las distintas fracciones de tamaños. El resultado mostró que existen diferencias significativas entre la abundancia de genotipos tóxicos; pero estas diferencias solo se observan entre las células individuales comparadas con cada una de las fracciones coloniales (Fig. 41). Sin embargo, normalizando los resultados por el biovolumen, proporción de genotipos tóxicos por biomasa, se observó que las células individuales tuvieron la mayor relación. Al no tener mucílago el biovolumen no estuvo sobreestimado. Aunque solo hubo diferencias significativas con las colonias M y G, no con P (Fig. 42).

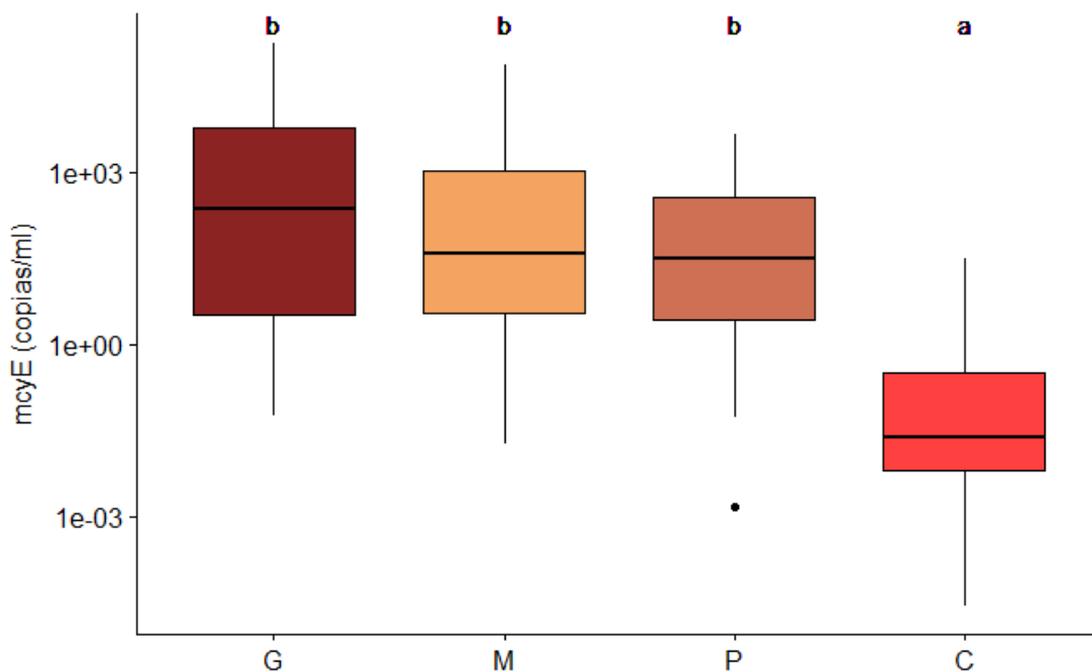


Fig. 41. Se muestran la abundancia de genotipos tóxicos (copias del gen *mcyE*/ml de muestra) en cada una de las cuatro fracciones, G (>150 μm), M (entre 150 y 60 μm), P (entre 60 y 20 μm) y C (< 20 μm). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre los grupos (p -valor<0,05). El eje Y está en logaritmo ($n=30$).

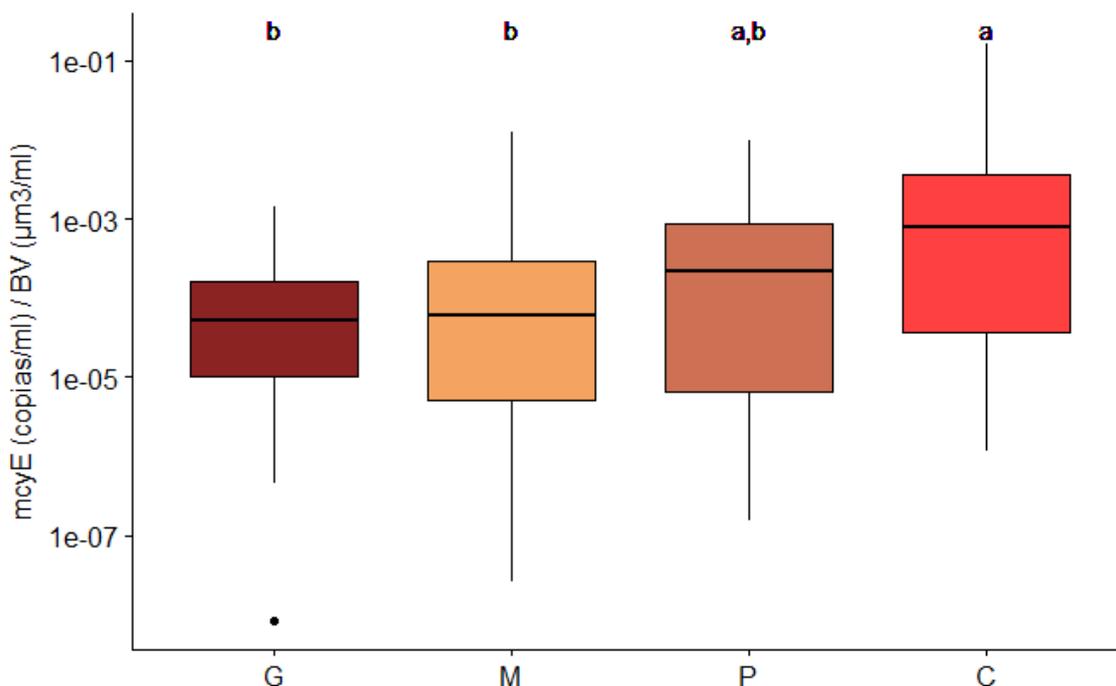


Fig. 42. Se muestra los valores de la relación *mcyE*/Bv en cada una de las cuatro fracciones. G (>150 μm), M (entre 150 y 60 μm), P (entre 60 y 20 μm) y C (< 20 μm). Las diferentes letras indican las diferencias significativas entre los grupos (p -valor<0,05). El eje Y está en logaritmo ($n=30$).

Con el fin de determinar qué variables son las más relevantes al explicar los cambios en la abundancia de genotipos tóxicos se estudiaron diferentes modelos de regresión lineal múltiple. Según estos modelos y en base a sus AIC, el biovolumen explicaría los cambios en la abundancia de los genotipos tóxicos en las diferentes fracciones. Las variables ambientales no presentaron un rol significativo para las fracciones G, M y P (colonias), ya que en estos casos los modelos <> y <<c>> tuvieron el mismo porcentaje de la variabilidad observada. Sin embargo, en la fracción C, el modelo elegido con el mayor porcentaje del R² fue el <<c>>. En esta fracción este modelo explicó un 39% de la variabilidad observada, por lo que en este caso las variables ambientales tuvieron un rol significativo sobre la abundancia de genotipos tóxicos (Tabla 11; Fig. 43).

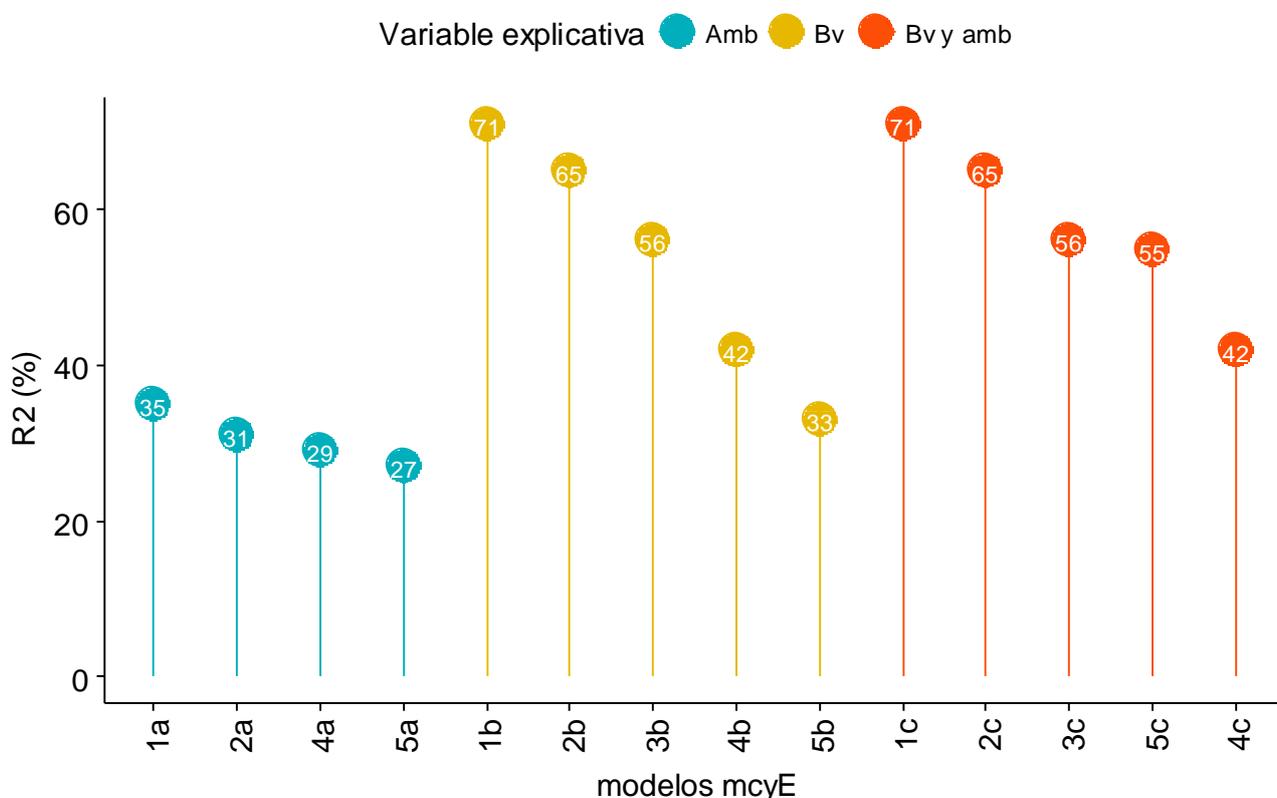


Fig. 43. Gráfico de barras que muestra los R² en porcentaje de los modelos lineales múltiples generados. Solo se muestra los R² mayores a 0%. Los colores corresponden a los tres tipos de modelos analizados. Azul: modelo en el que las variables ambientales fueron las variables explicativas. Amarillo: modelo en el que el biovolumen total y el de las fracciones fueron las variables explicativas. Rojo: modelo en el que las variables ambientales y los biovolúmenes fueron las variables explicativas. Los modelos totales van del 1a-c, fracción G (>150 μm) del 2a-c, fracción M (entre 150 y 60 μm) del 3a-c, fracción P (entre 60 y 20 μm) del 4a-c y fracción C (<20 μm) del 5a-c.

Además, de acuerdo a los modelos generados y en relación a las variables evaluadas se observó una diferencia entre los organismos mayores y menores a 60µm. El modelo 2c definió a la fracción P como la variable que sirve para explicar la abundancia de genotipos tóxicos, al igual que el modelo 4c; por lo que se observó que los modelos de las fracciones G y P fueron similares. Por otro lado, el modelo 3c definió los biovolúmenes mayores a 60µm como variables explicativas, con lo que no se observó diferencias entre los biovolúmenes de la fracción G y M. Por último, el modelo 5c definió la temperatura en negativo y su biovolumen como las variables que mejor explicaron la abundancia de genotipos tóxicos. Además, en el modelo de abundancia de genotipos tóxicos totales (1a-c) también se constató que solo con el biovolumen de las fracciones fue suficiente para explicar la variabilidad observada. En este caso la variable elegida fue el biovolumen de la fracción M como el factor que mejor explicó la variabilidad observada (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen de los modelos construidos. Se muestra el mejor modelo seleccionado con la función STEP AIC para cada variable <<y>>. * significa que no cumplió los supuestos para el modelo lineal y se ajustó como un glm. Los porcentajes corresponden al R², expresado en porcentaje significativos, para p-valor < 0.05. Las fracciones corresponden a G (>150 µm), M (entre 150 y 60 µm), P (entre 60 y 20 µm) y C (< 20µm).

y/x	a. Ambiente (T agua, Viento Inia, K)	b. Bv total y fracciones	c. Bv + ambiente
1. mcyE Total =	3.04 + 0.22 T agua 35% // AIC = 28.26	-0.09 + 0.51 Bv M 71% // AIC = -0.05	-0.09 + 0.51 Bv M 71% // AIC = -0.05
2. mcyE G =	2.02 + 0.21 T agua – 0.24 Viento 31% // AIC=27.35	0.19 + 0.76 Bv P 65% // AIC = 7.14	0.18 + 0.76 Bv P 65% // AIC = 7.14
3. mcyE M =	N.S	0.22 - 1.5 Bv total + 0.43Bv G + 1.47 Bv M 56% // AIC = 5.32	0.22 - 1.5 Bv total + 0.43Bv G + 1.47 Bv M 56% // AIC = 5.32
4. mcyE P =	2.32 + 0.13 T agua – 0.18 Viento 29% // AIC = 10.13	0.09 + 0.30 Bv P 42% // AIC = -0.26	0.09 + 0.30 Bv P 42% // AIC = -0.26
5.mcyE C * =	0.69 - 0.03 K 27% // AIC = -24.47	-0.128 + 0.26 Bv C 33% // AIC = -24.7	-0.33 + 0.43 Bv C - 0.05 T agua 55% // AIC = -31.7

Evaluación de la toxicidad del CMA mediante cuantificación del ARNm de *mcyE*

Para estimar si los genes *mcy* cuantificados se estaban transcribiendo enzimas en la producción de la toxina se cuantificó el número de copias de ADN copia (ADNc) del gen *mcyE* como proxy de producción de toxinas. Dado que existe una única copia de *mcyE* por célula, se muestra la abundancia de transcritos *mcyE* por célula, o sea la expresión de *mcyE* por célula de la colonia. Los resultados mostraron que la expresión del gen *mcyE* fue mayor en diciembre que en enero cuando el biovolumen fue menor. La mayor cuantificación del ARNm de *mcyE* en los tres sitios se obtuvo en M o en C lo que correspondió con un bajo biovolumen (Fig. 44).

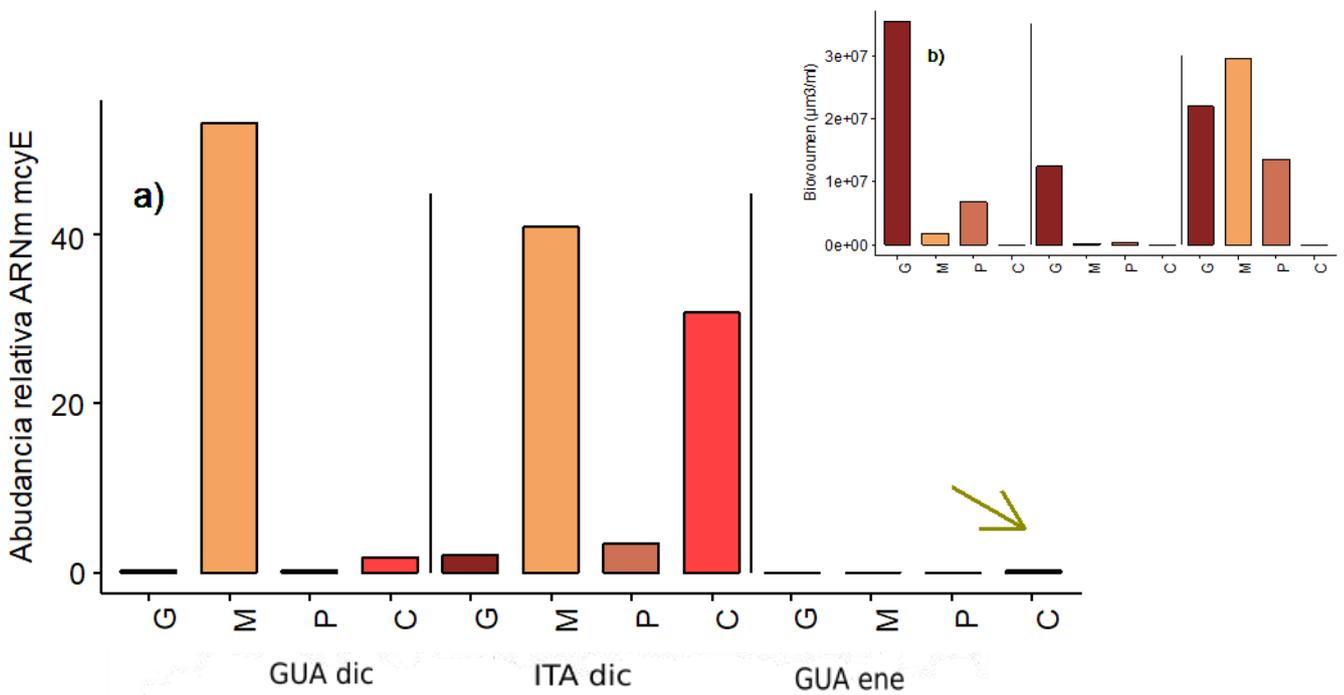


Fig. 44. Datos de la abundancia relativa de transcritos de *mcyE* expresada como valor relativo del ADNc sobre el ADN. La flecha verde corresponde a la fracción que alcanzó un mayor valor GUA en enero. Las rayas verticales separan los tres muestreos. Arriba a la derecha se muestran los datos de Bv en los mismos sitios de muestreo. Los colores equivalen a las cuatro fracciones, G (>150 μm), M (entre 150 y 60 μm), P (entre 60 y 20 μm) y C (<20 μm) (n=12).

Cuando se evaluó por fracción de tamaño, sin importar la procedencia del sitio, se encontró una gran concentración del ADNc *mcyE* en la fracción G. Sin embargo, al normalizar por el número de copias de *mcyE* (ADN), estandarización por el número de células, la fracción mediana aparece como la más activa en la transcripción de este gen; seguido de las células individuales lo que sugiere el rol de la microcistina como una señal celular a la hora de iniciarse la colonia (Fig. 45).

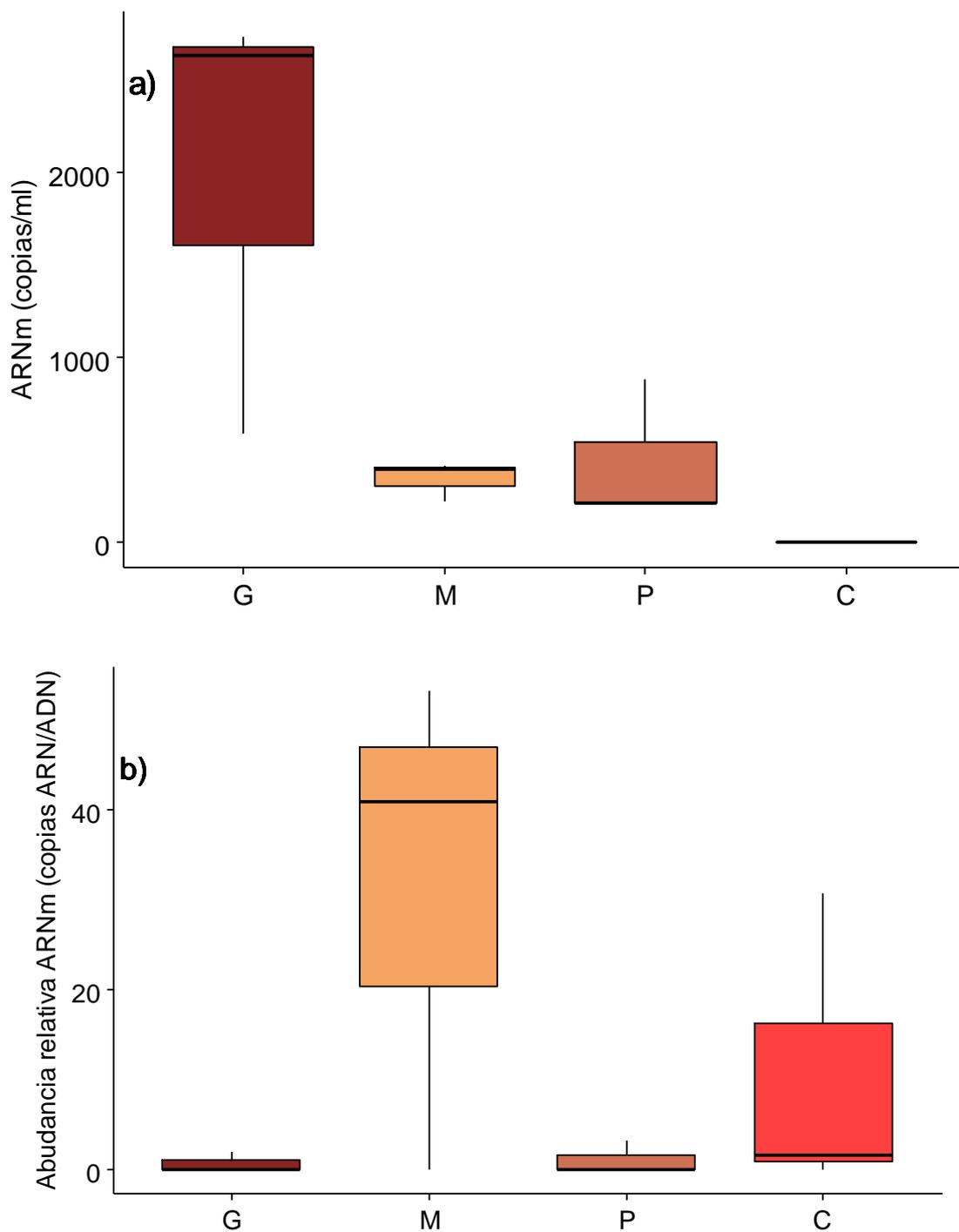


Fig. 45. a) Boxplot que muestra la concentración de cADN *mcyE* por ml de muestra en cada una de las cuatro fracciones b) Boxplot que muestra la abundancia relativa del ARNm *mcyE* calculado como las copias ARN/ copias ADN (transcripción de *mcyE* por célula). G (>150 μm), M (entre 150 y 60 μm), P (entre 60 y 20 μm) y C (< 20 μm) (n=12).

Evaluación de la toxicidad mediante la concentración de microcistinas

Con respecto a la concentración de microcistinas fue mayor en GUA que en ITA y fue mayor en enero que en diciembre al contrario que la expresión obtenida (Fig. 46). Las colonias mayores a 60 μm contribuyeron a más del 85% de la concentración total de microcistinas (89, 88 y 93 % respectivamente).

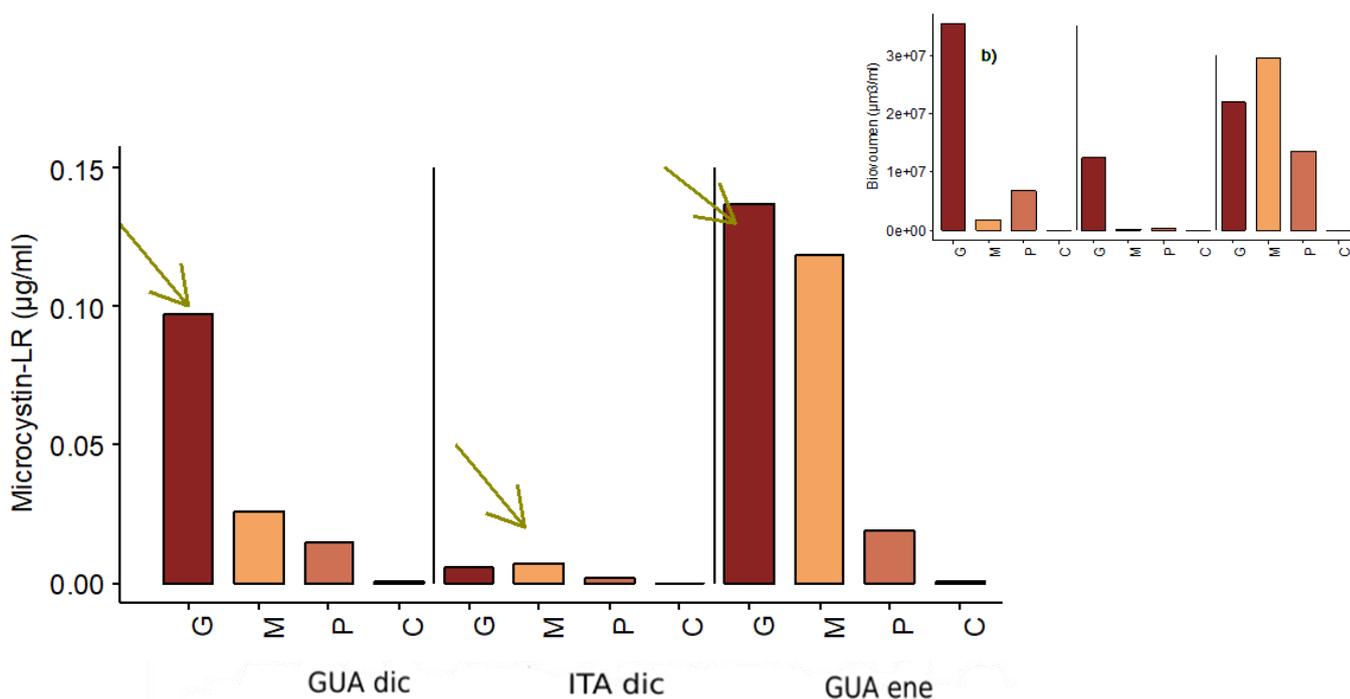


Fig. 46. Datos correspondientes a la concentración de microcistinas. Los colores equivalen a las cuatro fracciones, G (>150 μm), M (entre 150 y 60 μm), P (entre 60 y 20 μm) y C (<20 μm). Las flechas verdes corresponden a la fracción que alcanzó una mayor expresión del gen *mcyE* relativa al número de copias del mismo gen en cada punto de muestreo. Arriba a la derecha se muestran los datos de Bv en los mismos sitios de muestreo (n=12).

Por otro lado, al analizar la concentración de microcistinas (MC) en las distintas fracciones de tamaño, del mismo modo que se analizó anteriormente la abundancia de genotipos (concentración de MC por célula de la colonia), se observaron los mismos resultados que los obtenidos para el gen *mcyE* y por las copias de ADN copia. Se obtuvieron los valores más elevados en las colonias de mayor tamaño y los menores en las unicelulares, en orden decreciente (Fig. 47) y las diferencias en las varianzas y en la media fueron significativas. Sin embargo, en la fracción mediana se observaron las mayores concentraciones de microcistinas entre las fracciones coloniales cuando se estandarizó por número de copias de ADN, que equivale al número de células (Fig. 48).

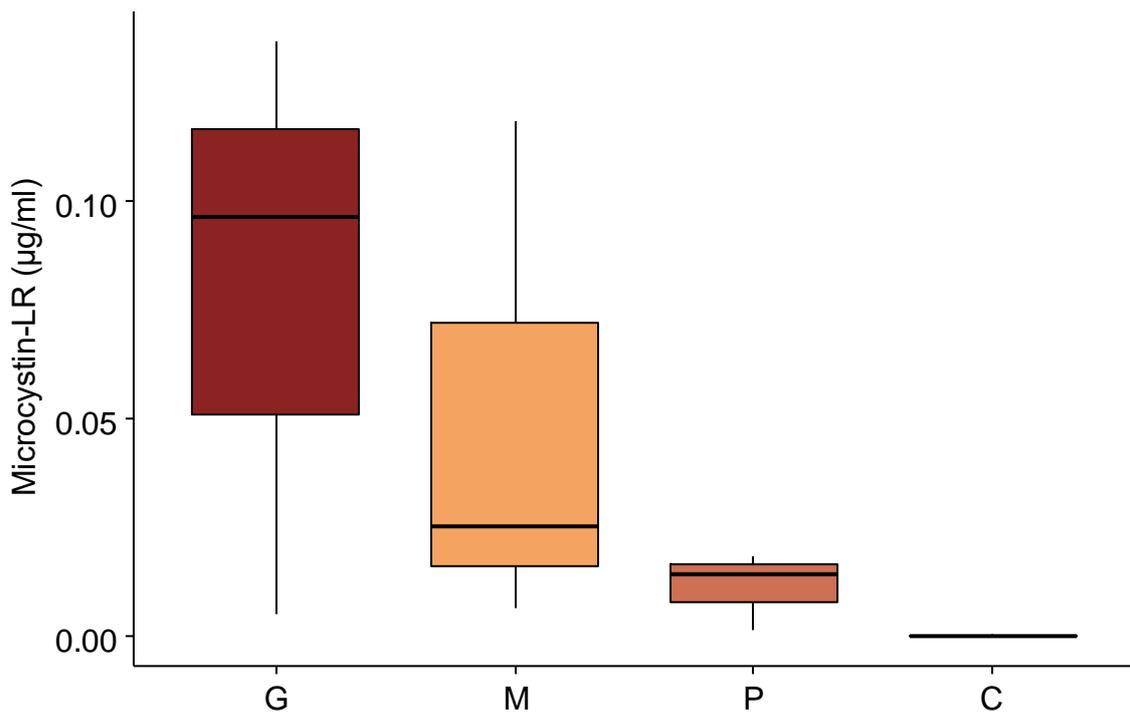


Fig. 47. Boxplot que muestra la concentración de microcistinas por litro de muestra en cada una de las cuatro fracciones, G (>150 µm), M (entre 150 y 60 µm), P (entre 60 y 20 µm) y C (<20µm). El eje Y está en log10 (n=12).

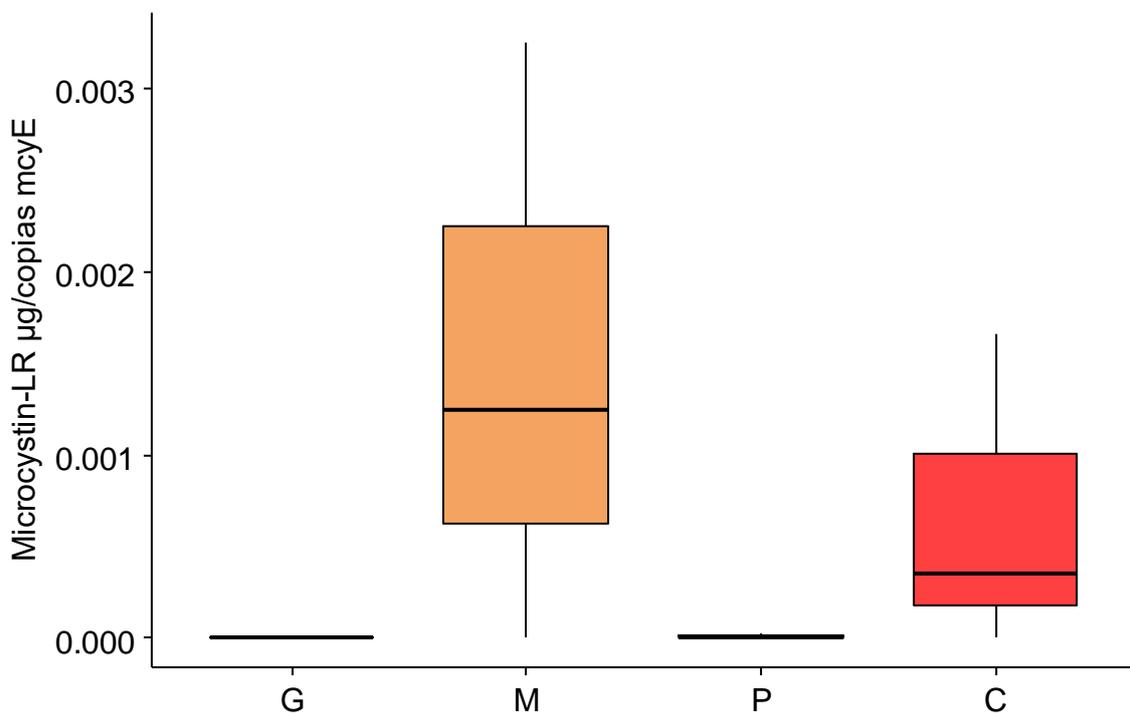


Fig. 48. Concentración de MC relativo al número de copias de ADN en cada una de las cuatro fracciones (MC por célula), G (>150 µm), M (entre 150 y 60 µm), P (entre 60 y 20 µm) y C (<20µm). (n=12).

Diversidad del gen *mcyJ* en las comunidades del CMA

Se analizó la variabilidad del gen *mcyJ* como proxy de la diversidad de poblaciones tóxicas del CMA. Se observó que, de acuerdo al análisis de cluster realizado con todas las muestras (septiembre + diciembre + enero) no existió una división definida de los datos (Tabla 2; Fig. 49). Sin embargo, al analizar únicamente los meses de verano las muestras se agruparon en dos clusters definidos de genotipos *mcyJ*. Esta división la definió el tamaño de 60 μm (Fig. 50). Esta misma división apareció cuando se analizaron los sitios por separado de dic y enero 2017 (Anexo I) pero solamente en ITA del muestreo de septiembre 2015 (Anexo I).

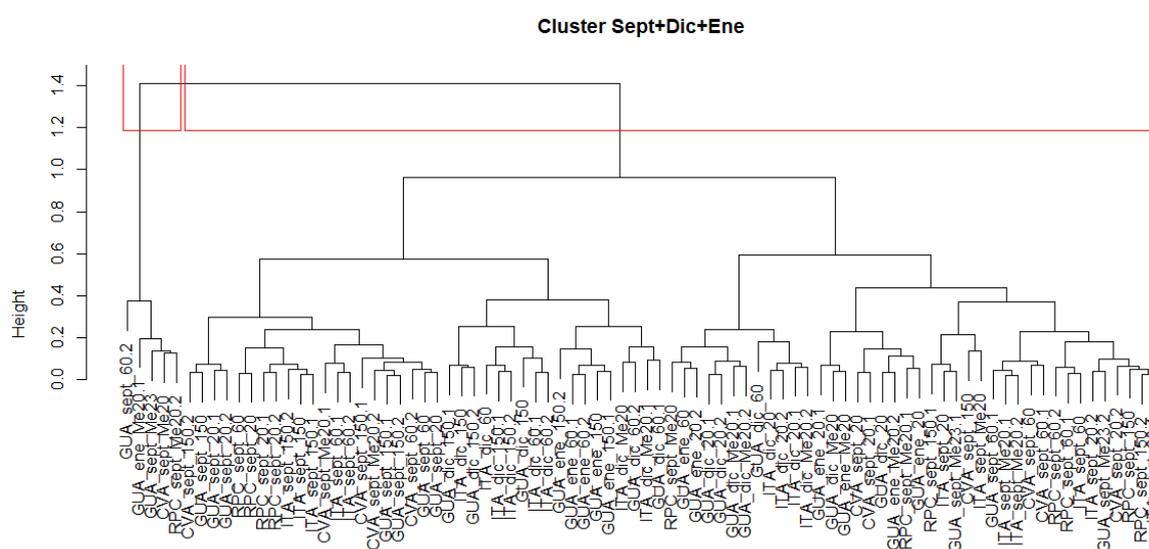


Fig. 49. Muestras de septiembre, diciembre y enero analizadas en conjunto. Los cuadrados rojos muestran las dos ramas principales del análisis. Los cluster se calcularon mediante la función *hclust* por el método euclidiano. Las matrices se traspusieron, centraron y escalaron.

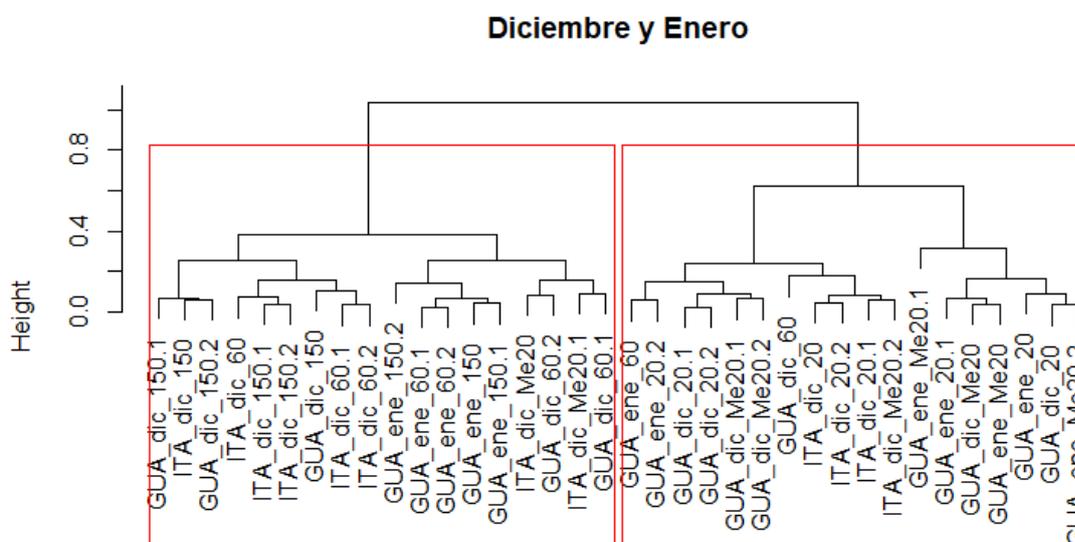
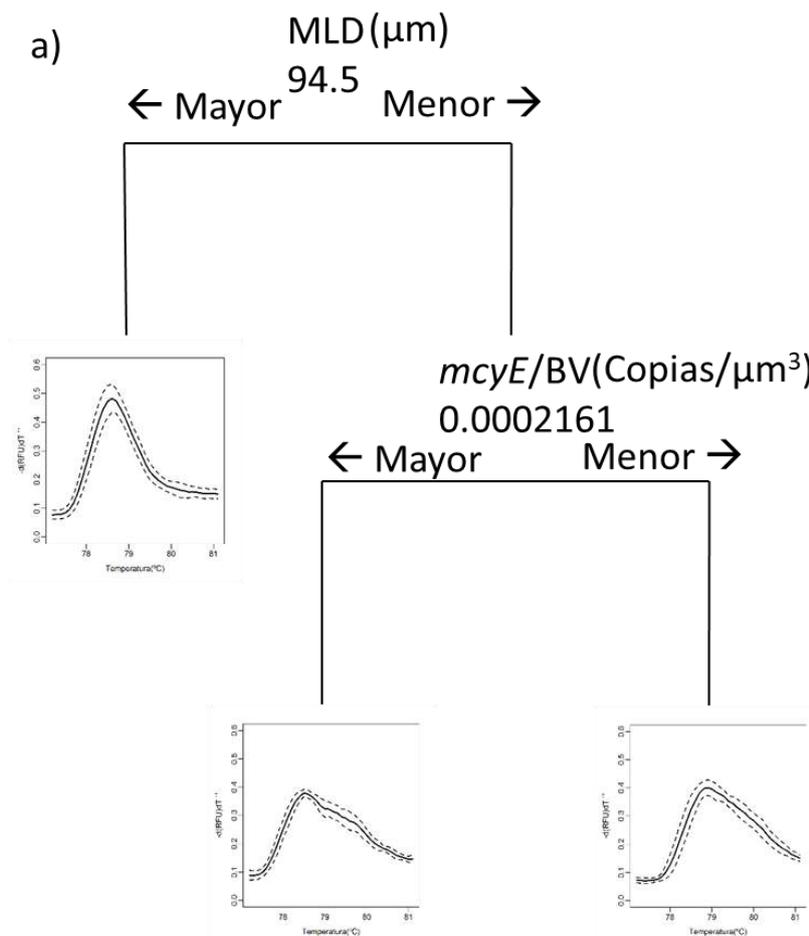


Fig. 50. Muestras de los meses de verano, diciembre y enero, de las dos estaciones analizadas GUA e ITA. Los cuadrados rojos muestran las dos ramas principales del análisis. Los cluster se calcularon mediante la función *hclust* por el método euclidiano. Las matrices se traspusieron, centraron y escalaron.

Con el fin de determinar si existía alguna relación entre el tamaño de los organismos y la diversidad del gen *mcyJ* encontrada mediante HRMA, se realizó un árbol de regresión CART. Este análisis definió como principal variable en categorizar la diversidad de genotipos tóxicos observada a la MLD y estableció como punto de corte para explicar las diferencias observadas al tamaño de 94,5 μm . Es decir que cuando los organismos poseen una MLD mayor a 94,5 μm constituyen un grupo genético homogéneo y definido, mientras que cuando este valor es menor a 94,5 μm la variabilidad estaría definida por una segunda variable, la relación *mcyE/Bv*. Así, se pudo determinar que valores de *mcyE/BV* mayores a 0.0002161 definen un grupo de genotipos diferente al de aquellos que presentan valores menores (Fig. 51a). Este valor de 94,5 μm estaría incluido en la división generada por el cluster, solo que en el cluster las divisiones son por franja de tamaños y por eso se estableció en 60 en la franja de la fracción mediana. En la fig. 51b se puede ver la división de cada genotipo acorde a las fracciones de la MLD y de la proporción de genotipos tóxicos por biovolumen.



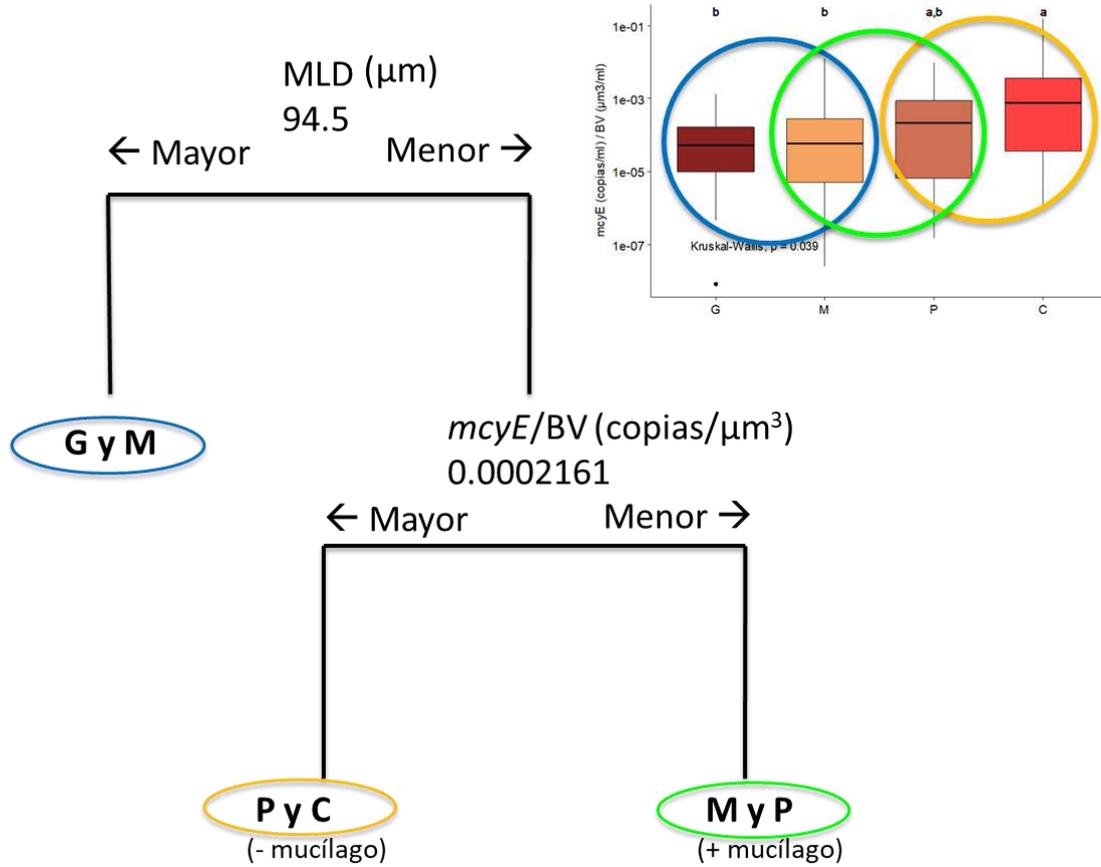


Fig. 51. Modelo CART donde la variable respuesta fueron los resultados del análisis del HRMA y como variables explicativas se establecieron: *mcyE*, *mcyE/Bv*, ARN/ADN, MLD, Volumen, Área, Bv y la abundancia. El árbol que se muestra es el árbol con el cp máxima. En a) se muestran los perfiles de melting de cada genotipo en cada nodo terminal y en b) se muestran cada fracción de tamaños en cada nodo terminal.

2.2.4. Discusión

La caracterización del embalse obtenida en esta tesis coincide con características previamente descritas (Bordett et al., 2017; O’Farrell e Izaguerri, 2014; O’Farrell, 2012). En este sentido, atribuiríamos los eventos de floraciones del embalse principalmente a dos variables ambientales: viento y temperatura. En nuestro estudio, los máximos vientos registrados fueron de 4 m/s y provenientes del NE, dirección e intensidad que propició la alta biomasa del CMA en el sitio de muestreo CVA. Además, esta alta concentración del CMA fue estable durante todo el año debido a que las colonias del CMA ascienden a la superficie en un lapso de minutos a horas (gracias a la presencia de vacuolas de gas protoplasmáticas) y dicha estabilidad se da en condiciones de vientos menores a 3 m/s (Reynolds et al., 1981).

La segunda variable relevante fue la temperatura. En nuestro estudio el rango temperatura registrada fue de 11-29°C, que se encuentra dentro del rango favorable para el crecimiento de los organismos del CMA. Esto propició que aparecieran eventos de floraciones en todas las estaciones climáticas y que no se encontraran diferencias significativas en la MLD ni en la abundancia de genotipos tóxicos entre el verano y el invierno. La temperatura fue similar entre los sitios de muestreo, por lo que en este caso dicha variable no marcó una diferencia en la MLD del CMA entre los sitios, si no que fue la variable profundidad. La relación del biovolumen con la temperatura fue lineal y positiva para el caso de las células individuales. En el caso de las fracciones coloniales, las tres fracciones tuvieron una relación positiva hasta alcanzar el pico máximo, alrededor de los 23°C, y después la relación fue negativa. Zhu et al., (2016) también observaron que el tamaño de las colonias del CMA disminuía con la temperatura. Con respecto a los rasgos específicos del CMA, los análisis de la MLD versus volumen y S/V fueron coherentes con su estrategia de vida descrita en la literatura. Esta implica que las colonias reducen su relación S/V como estrategia ecológica para regular su flotabilidad (Reynolds et al., 1981). La relación negativa y significativa entre la MLD y el S/V mostró una correcta labor en la estimación de los tamaños en el microscopio (Alcántara, 2015).

El biovolumen de cada fracción se relacionó positiva y significativamente con la abundancia de genotipos tóxicos, por lo que existe una relación entre la morfología y a la abundancia de genotipos tóxicos. Se observó que las colonias mayores a 150 µm tuvieron mayor número de copias del gen *mcyE*, aunque solo hubo diferencias significativas con las células individuales. Sin embargo, al estudiar la proporción de genotipos tóxicos (relativo al Bv, copias *mcyE*/Bv) se observó que la mayor abundancia correspondía a las muestras donde predominaban las células individuales sin diferencias significativas con las colonias entre 20-60 µm. Esta diferencia en los resultados se debe a la inclusión del mucílago al medir la MLD de las colonias, la cual aumenta según aumenta el tamaño de la colonia. Se ha descrito que el principio de la conservación de la morfología con una favorable relación superficie-volumen se fortalece mediante la formación de mucílago para envolver las células (Reynolds, 2006). La formación de colonias circulares mucilaginosas es una estrategia prevalente entre las cianobacterias de agua dulce. En el caso de *Microcystis* las células individuales solo ocupan el 20% de la estructura total de la colonia (Reynolds, 2006) y el 80% es mucílago, por ello las células individuales y las colonias de MLD menor a 60 µm alcanzaron una mayor proporción de genotipos tóxicos.

Como se mencionó anteriormente las comunidades del CMA están compuestas por genotipos tóxicos y no tóxicos. Siguiendo con esta relación de morfología – potencial tóxico, los modelos lineales múltiples mostraron que para las fracciones coloniales es posible estimar la abundancia de genotipos tóxicos en base al biovolumen e independientemente de las variables ambientales. Sin embargo, el ambiente sí aporta en la estimación de los genotipos tóxicos en las células individuales, ya que la temperatura afecta negativamente a los genotipos tóxicos de las células individuales. Uniendo estos resultados con lo mencionado anteriormente, podemos afirmar que las altas temperaturas favorecen que las colonias se disgreguen en células individuales y que estas serán potencialmente no tóxicas. Además, los modelos lineales múltiples mostraron, en primer lugar, que la abundancia de genotipos tóxicos totales (de toda la comunidad) se explicó por el biovolumen de las colonias M (60 – 150 μm) (confirmando lo descrito en el capítulo anterior). El potencial tóxico de las colonias del CMA no tiene una relación lineal con la MLD donde la fracción M sería la fracción potencialmente más tóxica. En segundo lugar, que el potencial tóxico de la fracción G se explicó por el biovolumen de las P, lo que sugiere que las fracciones podrían separarse y volver a la fracción P al alcanzar un tamaño y un estado de senescencia. Esto contradice que el máximo tamaño estacional de las clases más pequeñas (<50 μm) durante su período de crecimiento sería consecuencia de su crecimiento y no de la fragmentación de las más grandes, como plantearon Kurmayer et al. (2003).

La diferencia observada en las distintas fracciones entre los diferentes sitios de muestreo puede deberse a una diferencia genotípica asociada a la MLD de los organismos y esta a su vez asociada a unas determinadas condiciones ambientales. El CMA está compuesto por especies que forman colonias que alcanzan diferentes MLD. Por ejemplo, *M. aeruginosa* crece generalmente formando colonias largas. Sin embargo, las colonias del *M. flos-aquae* y *M. ichthyoblabe* forman colonias grandes fácilmente disgregables que se dispersan en fracciones coloniales más pequeñas por acción del viento. Esto hace que al muestrearlas se cataloguen como colonias pequeñas, cuando en realidad provienen de grandes colonias (Watanabe et al., 1996).

La diferente potencialidad tóxica exhibida por las diferentes fracciones se confirmó al analizar la abundancia de transcriptos del gen *mcyE* y la concentración de microcistinas. Tanto la fracción M como las células individuales mostraron una mayor abundancia de transcriptos del gen *mcyE* y una

mayor concentración de microcistinas por célula, lo que sugiere que la diferencia en el potencial tóxico entre las fracciones no estaría determinada por el número de células con capacidad de sintetizar microcistinas, sino por la actividad celular en la transcripción y la producción de la toxina en cada fracción.

En base a la información de la literatura y a los hallazgos de esta tesis, proponemos que la microcistina podría tener un rol como molécula de señalización celular (Wang et al., 2013). En un trabajo en el que se evaluó si la densidad celular en las cianobacterias podría inducir la producción de compuestos bioactivos, Pereira et al. (2014) sugirieron que el *quorum sensing* sería un mecanismo importante en la regulación de la fisiología de una floración, ya que jugaría un papel significativo en la producción de péptidos tóxicos y no tóxicos. Por ello, la formación de colonias se asociaría a la formación de un *biofilm* donde la expresión de la toxina extracelular sería necesaria para el crecimiento colonial (Jungman et al., 1996) y para el mantenimiento del tamaño (Gan et al., 2012). La fluctuación en la concentración de microcistinas se puede atribuir al desarrollo de las colonias en estado de crecimiento (Kurmayer et al., 2003) y plantea la hipótesis de que la fracción M sería la más favorecida por las condiciones ambientales, encontrándose en una fase de crecimiento exponencial al momento del muestreo. Por el contrario, las fracciones mayores a 150 μm se encontrarían en su estado de senescencia y por tanto, menos activas en la producción de toxinas. Además, las colonias más grandes tienen una mayor capacidad para flotar: las colonias mayores a 150 μm se concentran en la superficie del agua por lo que reciben una mayor luz solar y pueden sufrir una inhibición en la producción de microcistinas (Wang et al., 2013).

Las concentraciones más altas de microcistinas en la fracción M se encontraron en muestras con menor biovolumen. Asimismo, observamos que una vez que las colonias van creciendo y la floración aumenta su biomasa, la expresión génica disminuye, implicando una relación entre el tamaño de la colonia y su actividad productora de toxina. Varios estudios han mostrado que la concentración media de microcistinas expresada por célula es típicamente mayor al inicio de una floración pero mucho más baja en el pico de estas floraciones (Kardinaal y Visser, 2005; Welker et al., 2003; Welker et al., 2007). En otras palabras, cuando incrementa la biomasa del CMA, las células del CMA empiezan a ser menos tóxicas (Kardinaal et al., 2007b). Los cambios en la transcripción varían según el crecimiento de la colonia, por lo que se vuelve a plantear el rol de la microcistina como una señal a la hora de iniciarse la colonia (Jungman et al., 1996). Kardinaal et al. (2007a) encontraron que la alta

concentración de microcistinas en el comienzo de una floración se relacionaba con la presencia de los genotipos tóxicos y que la baja concentración de microcistinas durante el pico de la floración coincidía con la dominancia de los genotipos no tóxicos. En este sentido, es posible que la competición por la luz juegue un papel fundamental en la sucesión estacional entre genotipos tóxicos y no tóxicos en las floraciones del CMA. El incremento gradual de la biomasa del CMA durante el período de floración causa una sombra considerable y por ello la luz disponible para el crecimiento se ve limitada. El reemplazo competitivo de las tóxicas por las no tóxicas ofrece una explicación plausible para la reducción gradual de la media de la toxicidad por célula durante el desarrollo de las densas floraciones algales (Kardinaal et al., 2007b).

El análisis de la diversidad de estos genotipos tóxicos (mediante el gen *mcyJ*) obtenida en el HRMA mostró que en los meses de verano la composición genotípica del gen *mcyJ* puede separarse en dos grupos de genotipos cuya principal característica morfológica es que difieren en su tamaño, un genotipo cuenta con organismos cuya MLD es mayor a 60 μm mientras que en el otro genotipo son menores. Estos resultados concuerdan con Wang et al. (2013) que encontraron, mediante la técnica DGGE, una diferencia del gen *mcyJ* entre las colonias mayores y menores a 50 μm . Esta división basada en la MLD también se observó en los clusters de los diferentes sitios de muestreo por separado tanto de los meses de verano como del mes de septiembre con un clima primaveral. Sin embargo, no se encontró esta división en el análisis del cluster de los meses de verano y primavera en conjunto. Esto podría explicarse por la transición entre organismos de diferentes MLD, por ejemplo mediante fragmentación de las colonias más grandes durante el ciclo de crecimiento (Reynolds et al., 1981); por lo que un genotipo podría estar incluido en el genotipo de organismos de menor MLD. Es plausible entonces hipotetizar que existen distintos genotipos tóxicos del CMA con diferencias morfológicas, lo cual debe estar sin duda ligado a su capacidad para sintetizar microcistina. Esta división por la MLD del gen *mcyJ* se confirmó con el análisis estadístico de árbol de regresión (CART). El CART mostró diferencias en la composición del gen *mcyJ* en tres genotipos distintos separados en base a la morfología (separó uno de los genotipos en otros dos genotipos porque se analizó con más variables que el cluster). El primer genotipo serían las colonias mayores a 94,5 μm (MLD incluida en la fracción entre 60-150 μm (M) establecida en el cluster), lo que correspondería a la fracción G y parte de la M. El segundo genotipo serían las colonias menores a 94,5 μm y con mayores proporciones de genotipos tóxicos acordes a su biovolumen (fracción C y parte de las P) y el tercer genotipo serían colonias menores a 94,5 μm y menores proporciones de genotipos tóxicos acordes a su biovolumen (fracción

P y parte de las M). Uniendo los resultados del cluster y del CART, los datos indican que una población determinada del CMA tendrá una determinada morfología y toxicidad, sugiriendo que la capacidad de sintetizar microcistinas estaría ligada de alguna manera a la formación y mantenimiento de las colonias.

A modo de resumen vale destacar que existe una relación positiva no lineal entre la morfología (MLD y mucílago) y la abundancia de genotipos tóxicos. Las fracciones de mayor MLD se asociaron a la mayor abundancia de genotipos tóxicos como resultado del mayor número de células, pero no es la diferencia en el número de copias si no en la actividad de las células tóxicas lo que marca la relación entre la morfología y la toxicidad. La fracción M alcanzó mayores concentraciones de microcistinas y mayor actividad en la transcripción del ARNm, por lo que la alta abundancia de organismos entre 60 - 150 μm de la MLD es un indicador de la presencia de floraciones potencialmente tóxicas en los cuerpos de agua. Estas diferencias vienen asociadas a una diferencia en la composición del gen *mcyJ* en tres genotipos distintos separados en base a la morfología. Existen genotipos que crecerían hasta alcanzar valores de la MLD mayores a 150 μm y genotipos que no alcanzarían valores mayores a 60 μm . Se concluye que existe diferencia entre la composición genotípica de los organismos de diferente MLD y en los períodos de floración, usualmente en verano, es donde se observó una clara relación morfología-potencial tóxico; por lo que el tamaño podría usarse como indicador de la calidad del agua. Estos resultados aportan al conocimiento acerca de los mecanismos que intervienen en la formación de las colonias (las colonias se forman mediante división celular y no por agregación de células como sugieren algunos autores) y del posible rol de la microcistina en la comunicación celular para el inicio y mantenimiento de la colonia.

Capítulo 3: Tamaño, potencial tóxico y propiedades ópticas de comunidades naturales con presencia de CMA

3.1. Introducción

Considerando la gran importancia de la absorción de la luz por el fitoplancton es necesario conocer las propiedades ópticas del fitoplancton en los sistemas acuáticos (Wojtasiewicz y Stoń-Egiert, 2016). Las especies de fitoplancton están caracterizadas por su valor único de absorción y dispersión de la luz, lo que resulta de las diferencias en el tamaño y forma de las células, en la estructura interna de los organismos y en la composición de los pigmentos (Aguirre-Gómez et al., 2001; Vaillancourt et al., 2004; Whitmire et al., 2010). Como se discutió anteriormente, la luz tiene un rol principal en la síntesis de toxinas. Además, las floraciones del CMA tienden a acumularse en las capas superficiales de los cuerpos de agua, por lo que es posible registrarlas con sensores remotos. Es por ello que en este último capítulo se agrega un rasgo más de las comunidades del CMA: las propiedades ópticas inherentes. Para ello en este capítulo se estudiaron las propiedades ópticas del CMA mediante la toma de fotos con la cámara de un teléfono móvil y la aplicación <<Hydrocolor>> que permite calcular los valores ópticos de la reflectancia del agua (R_{rs}) (Leeuw, 2014). En este tercer capítulo se evaluó el análisis de espectros de luz reflejada por las muestras de agua con floraciones y sin floraciones de CMA. Las imágenes obtenidas con la aplicación del teléfono móvil se relacionaron con los resultados del segundo capítulo con la intención final de generar un modelo matemático de detección de floraciones potencialmente tóxicas.

3.2. Materiales y métodos

Muestreos

Además de los muestreos descritos en el capítulos 2.2., se realizaron dos muestreos en las playas de Montevideo. Un primer muestreo en la playa de Ramírez y un segundo en playa verde en febrero del 2016 (n=32). En estos muestreos el cálculo del biovolumen y el análisis de la abundancia de genotipos tóxicos se realizaron igual que lo descrito en el capítulo anterior.

Medidas ópticas

La toma de fotos se realizó con la cámara (8 Mpx, 3264x2448 píxeles, flash LED) incluida en el teléfono móvil iPhone 5C y se analizaron mediante la aplicación denominada Hydrocolor (Leeuw, 2014). Esta es una aplicación que utiliza las imágenes registradas para calcular y analizar la reflectancia de los cuerpos de aguas naturales (Mobley, 1999) y devuelve valores de turbidez del agua (0-80NTU) y el valor de reflectancia (R_{rs}) en las tres bandas (roja, verde y azul) (1/sr). Las imágenes se tomaron en lugares donde el agua era suficientemente profunda o turbia para evitar la influencia del fondo en las mediciones ópticas del agua. Cada valor de reflectancia fue calculado mediante 3 imágenes. La primera imagen se obtiene sobre una carta gris de referencia radiométrica, la segunda se toma del cielo y la tercera de la superficie del cuerpo de agua. La intensidad de la energía lumínica reflejada en la superficie del agua se elimina primero de la energía que proviene del agua restando los valores de la imagen 'cielo' a la imagen 'agua'. La segunda corrección radiométrica de la medición de agua se efectúa mediante la división de la energía lumínica que viene del agua por la energía incidente en la superficie del agua y estimada a partir de la imagen de la carta gris de referencia. Esta normalización es el mismo procedimiento que se utiliza para calcular R_{rs} . El programa de Hydrocolor utiliza información derivada de diferentes sensores ubicados en el teléfono móvil (e.g., el GPS, el compás y el giroscopio) y teniendo en cuenta la localización del sol dirige al usuario al ángulo correcto de azimuth en donde el reflejo del sol es mínimo (e.g., 135°). Además, el inclinómetro permite obtener las imágenes para el agua y la carta gris de referencia con un ángulo nadir de 40°, y las imágenes del cielo con un ángulo zenith de 40° (Leeuw, 2014; Mobley, 1999) .

Test preliminar con la aplicación Hydrocolor

Previo al uso del sistema para evaluar la relación entre tamaño, toxicidad y óptica se realizaron tres tipos distintos de ensayos dirigidos a su calibración incluyendo: 1) ensayos con distintas concentraciones conocidas de CMA, 2) ensayos tomando fotografías en distintas condiciones ambientales (lluvia, sol y distinto porcentaje de cobertura de nubes) y a distintas alturas del agua y 3) ensayos comparando los datos obtenidos con la aplicación del móvil y un radiómetro en miniatura marca Q-mini. Los objetivos de estos ensayos fueron 1) Calcular la concentración mínima de colonias que la aplicación podía detectar; 2) Comprobar si el valor de R_{rs} cambiaba según las condiciones climáticas o según la altura de las fotos y 3) Comprobar si los valores obtenidos con la aplicación eran similares a los obtenidos con un radiómetro.

1) Para el primer ensayo se tomaron muestras concentradas de CMA en el mes de diciembre del 2016 y de enero del 2017 mediante un arrastre de 3 min con una red de 100 µm de poro en el embalse de Salto grande en un balde negro para evitar la reflectancia del fondo del balde. Con estas muestras se realizaron 5 curvas de calibración donde se fue diluyendo el volumen inicial de 5,4 L de muestra y se contaron el número de colonias por ml. Estas curvas se realizaron en cinco días distintos caracterizados por diferentes condiciones de luz (Fig 50 y Anexo I). 2) y 3) Para el segundo y el tercer ensayo las mediciones ópticas con la aplicación del móvil se realizaron en el puerto de Rimouski (Quebec, Canadá), en el contexto de una pasantía financiada por PEDECIBA biología y por el CISC en el verano boreal del 2016. 2) En el segundo ensayo las fotografías se tomaron en el mismo punto del puerto y se variaron las condiciones climáticas o la altura. Para el ensayo de la altura se realizó en el mismo día. Para el ensayo de las diferentes condiciones climáticas se mantuvo la usada en los muestreos del capítulo 2.2, a la altura de la cintura. 3) Para el tercer ensayo fue necesario calcular el valor del Rrs obtenido por el radiómetro (Q-mini, intervalo de longitud de onda = 350-1100 nm, Pembroke Inc.*). Para la toma de fotografías por parte de ambos dispositivos siempre se usaron las mismas cartas de referencia (blanca, gris y negra). A partir de los resultados del radiómetro, expresados en nanoW se calcularon los tres componentes de la radiancia: la del agua que incluye contribuciones reflejadas de la interface agua-aire (L_{ws}), la del cielo (L_c) y la de la carta gris de referencia (L_r) (Ecuaciones 4 y 5). Para el cálculo de los diferentes L se usaron las longitudes de onda (λ) en cada color de banda más cercanas al valor de λ usado por la aplicación del móvil y para los valores por encima y por debajo de ese valor: 598nm (rojo), 534nm (verde) y 449nm (azul), de tal manera que se obtuvieron tres valores de L_{ws} total, L_c y L_r en cada color.

Rojo tres valores de λ : 597.9, 598.2 y 598.6 nm

Verde tres valores de λ : 533.7, 534.0 y 534.4 nm

Azul tres valores de λ : 448.8, 449.1 y 449.5 nm

$$\bar{L} = \frac{\sum_{j=1}^3 \sum_i^{10} X_i^{(\text{área del detector} * \text{ángulo sólido} * \lambda)}}{10}$$

X es el valor en nanoW medido por el radiómetro, el área del detector vale $1.4 \text{ e}10^{-9} \text{ m}^2$ y el ángulo sólido vale 14 sr.

L_{ws} se obtiene restándole el L_c del cielo, porque la medida del radiómetro es una reflexión total del agua, incluida la del cielo. Así que:

$$L_{ws} = L_{ws} \text{ total} - 0.02 L_c$$

Después para calcular el valor de irradiancia (E_d) necesario para obtener el R_{rs} (ecuación 1) se:

$$Ed = \frac{Lr * \pi}{\rho r}$$

pr fue la reflectividad de la cartas de referencia radiométrica (i.e., 15%, 18% and 95% para la carta negra, gris y blanca, respectivamente). Finalmente el R_{rs} se calculó según la ecuación 1 descrita anteriormente:

$$Rrs = \frac{Lws}{Ed}$$

* Shimadzu UV-1601, intervalo espectral = 300-750 nm, resolución espectral = 0.2 nm, exactitud = +/- 0.004 Abs a 1.0 Abs.

Cálculos del índice g440

Las muestras guardadas según lo descrito en la fig. 17 se filtraron por GF/F de fibra de vidrio de tamaño de poro igual 0.7 micrones que habían sido previamente pesados y calcinados a 450 °C durante 4 horas. A continuación se midió la absorbancia de las muestras filtradas en cubetas de cuarzo (longitud de camino óptico = 3 cm) mediante un dual beam espectrofotómetro *. Con esos valores se calculó el coeficiente de absorción del material disuelto a una longitud de 440 nm (g440) mediante la ecuación:

$$g_{440} = \frac{2.303 (A_{440} - A_{750})}{PL}$$

(Kirk, 1994)

El valor 2,303 convierte a una base de log₁₀, A_λ es la absorbancia a dicha longitud de onda y PL es la longitud de la cubeta óptica en m (0.01 m). La absorbancia a una longitud de onda de 750 nm se asume que es dispersión residual y se resta del efecto de la absorbancia a 440nm.

Razones ópticas

Acorde a la literatura se estudiaron tres razones ópticas. En la Tabla 11 se describen las razones, su interpretación, que tipo de relación existe y las referencias.

Tabla 11. Descripción de las razones ópticas encontradas en la literatura.

Descriptor	Interpretación	Relación	Referencias
Razón R _{rs} Rojo / R _{rs} Verde	Se relaciona directamente con la turbidez e inversamente con la clorofila	Lineal	Leeuw et al, 2014 White et al, 2005 Tzortziou et al, 2006
Razón R _{rs} Rojo / R _{rs} Azul	Se relaciona directamente con el g440	Lineal	Goddijn and White, 2006 Hougane et al, 2011
Razón R _{rs} Azul / R _{rs} Verde	Se relaciona inversamente con la clorofila	Lineal Lineal Exponencial	Beckett, 2005 Goddijn and White, 2006 Goddijn-Murphy et al. 2010

Análisis de datos

Los gráficos de boxplot, plots, barras e histogramas se realizaron con el paquete *ggpubr* y en los análisis estadísticos siempre se consideraron los valores de probabilidad de aceptar la hipótesis nula a un nivel de confianza de 95% ($p \leq 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa libre R, versión 3.0.2 (R Core Team, 2017).

Para estudiar la relación entre las razones ópticas y el biovolumen o entre las razones ópticas y la abundancia de genotipos tóxicos se utilizó una matriz de correlación mediante la función *cor* con enfoque no paramétrico (Spearman) (Becker et al., 1988). Para evaluar la relación entre las distintas variables también se empleó un enfoque de tipo no paramétrico de Spearman (R^2) el cual se definió en función de la estructura de los datos. Para determinar diferencias significativas entre las variables analizadas se aplicó el análisis no paramétrico Wilcoxon para pares de datos y Kruskal-Wallis para varios grupos de datos independientes.

Para analizar la relación entre la abundancia de genotipos tóxicos y las propiedades ópticas se realizaron tres modelos con enfoques diferentes. En los tres modelos la variable respuesta fue la abundancia de genotipos tóxicos (*mcyE* total) en log10 y las variables explicativas fueron la temperatura, el viento, la conductividad, la turbidez medida en la aplicación (NTU), la razón rojo/verde y la razón azul/verde. El primer modelo fue un modelo de regresión lineal múltiple. Se alimentó con el total de variables y el mejor modelo final fue elegido mediante la selección *backward* y se compararon basándose en el criterio de información de Akaike (AIC) (Burnham and Anderson, 2002). El segundo modelo fue un árbol de clasificación y regresión (CART) con la función *rpart* (Breiman, Friedman, Olshen and Stone, 1984) en el cual se estableció un $cp=0.00001$. El tercer modelo fue un *Random forest* con la función *randomforest* y con el $ntree=500$ (Liaw and Wiener, 2002). Para evaluar los errores en cada uno de los tres modelos se calculó como el error medio de un *loop* de 100 validaciones cruzadas donde 2/3 de la muestra se usaron como datos de entrenamiento y 1/3 como datos de prueba. El valor de todos los errores se graficó en histogramas mediante la función *ggdensity*.

Además de los modelos mencionados se realizaron dos modelos (CART y rf) con la variable <<y>> categorizada y con las mismas variables explicativas. Se dividió la variable *mcyE* total en dos categorías que se establecieron anteriormente en nuestro grupo de investigación. El límite está en 2000 células/ml, pero se tomó la mitad porque solo estamos cuantificando las células tóxicas (Martinez de la Escalera et al., 2017) y se considera una copia/m equivale a una célula: 1) Baja abundancia (B = menos de 1000 copias/ml), donde no presenta un riesgo para la salud pública y 2) Alta abundancia (A= más de 1000 copias/ml) característica de floraciones de cianobacterias y que representa un riesgo para la salud humana (Falconer et al., 1999; WHO, 2004). Para medir la fiabilidad de cada modelo se obtuvo su correspondiente matriz de confusión donde se representaron los valores predichos contra los observados (Tabla 12).

Tabla 12. Matriz de confusión. Las entradas que deben ser maximizadas en un modelo de clasificación están resaltadas en negro. El falso negativo (subrayado) debería ser mínimo ya que implica que el modelo detecta baja concentración de genotipos tóxicos cuando la abundancia es alta.

		Predicho	
		A	B
Observado	A	Positivo verdadero	<u>Falso negativo</u>
	B	Falso positivo	Negativo verdadero

Los valores de la matriz es el número de veces que el modelo predijo la categoría adecuadamente (positivos verdaderos o negativos verdaderos) y el número que predijo la categoría erróneamente. La exactitud del modelo representa la fracción de los bien clasificados sobre el número total de observaciones (n=30):

$$\text{Exactitud} = (\text{Positivo Verdadero} + \text{Negativo Verdadero}) / \text{Número total de observaciones}$$

La sensibilidad se calcula como la fracción de los predichos correctamente entre el número total de los valores positivos.

$$\text{Sensibilidad} = \text{Positivo verdadero} / (\text{Positivo verdadero} + \text{Falso negativo})$$

3.3. Resultados

Caracterización de la aplicación <<Hydrocolor>>

Con respecto a la caracterización de la aplicación se constató que la turbidez del equipo midió valores entre el cero y los 80 NTU, si la turbidez fue mayor de 80, el equipo marcó >80 NTU como valor para la turbidez. En los sitios donde el turbidímetro nos midió cero el Hydrocolor también dio cero. Se observó que ambos valores de turbidez que estuvieron linealmente relacionados ($Turbidez (NTU) = 11.56 + 0.31 \text{ Turbidez app}$, $R^2 = 0.20$). Además acorde a la literatura se obtuvo una relación positiva y significativa entre el g440 y a la razón roja/azul ($Rojo/Azul = -5.5 + 6.8 \text{ g440}$, $R^2 = 0.21$) (Tabla 11). En nuestro trabajo el rango de la profundidad en la que se reflejó la luz fue entre 0,059 y 0,382 m (Fig. 52). Los valores obtenidos en las tres franjas (rojo, verde y azul) fueron entre 0.004 hasta 0.035. Los valores más altos correspondieron a la franja roja y verde, dependiendo de si hubo floración o no. El color azul, correspondiente a agua pura, siempre alcanzó valores más bajos (Fig. 53).

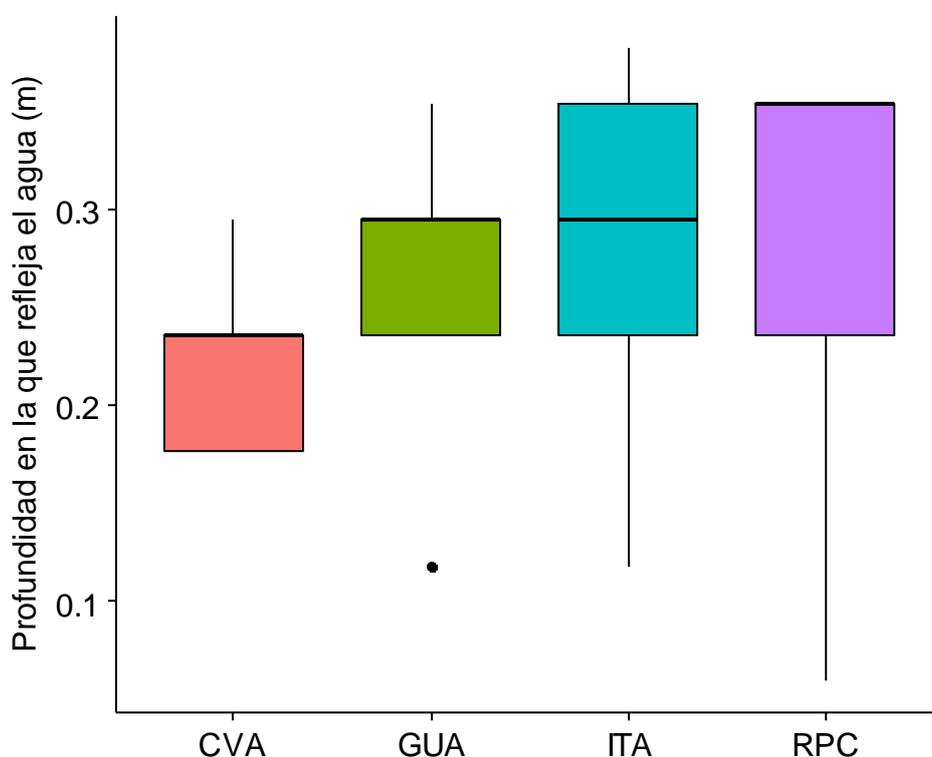


Fig. 52. Profundidad en la que el agua reflejó la luz en los diferentes sitios de muestreo en el embalse de Salto Grande. Se midió como $1/k_d$ (m) y el K_d se midió como $1.7/\text{Disco de Secchi}$ (Wetzel, 1983) ($n=30$).

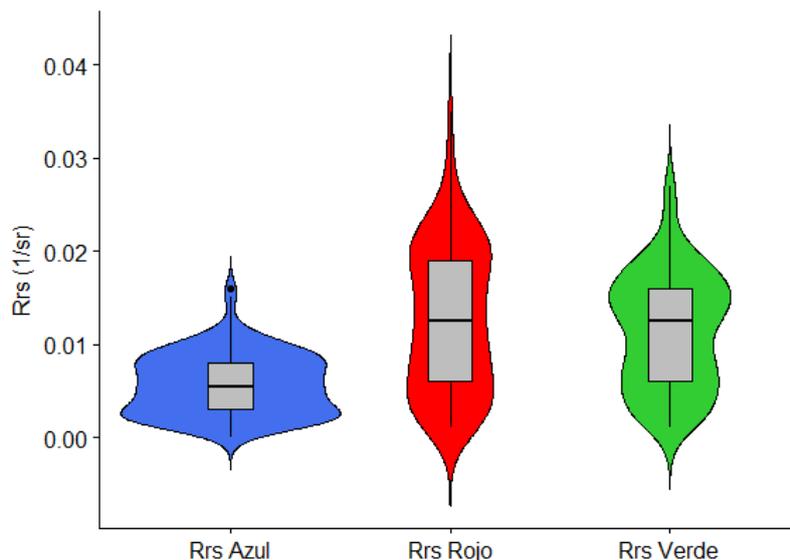


Fig. 53. Se muestran los valores del Rrs en las tres bandas de luz (azul, rojo y verde) obtenidos en todos los muestreos. Las formas de las cajas representan el histograma de la variable (n=124).

Con respecto a las razones, los valores de la razón rojo/verde oscilaron entre 0.7 y 1.5 y los valores de la razón azul/verde oscilaron entre 0.2 y 1. Los valores de 1 solo se obtuvieron en sitios donde el agua era transparente, como en la laguna del Pinar. Ese valor correspondió al valor obtenido al final de la última dilución en las curvas de calibración. El valor más alto de la razón rojo/verde se obtuvo en el RPC en el mes de julio que correspondió con un alto valor de turbidez (>80 NTU) (Fig. 54; tabla 11).

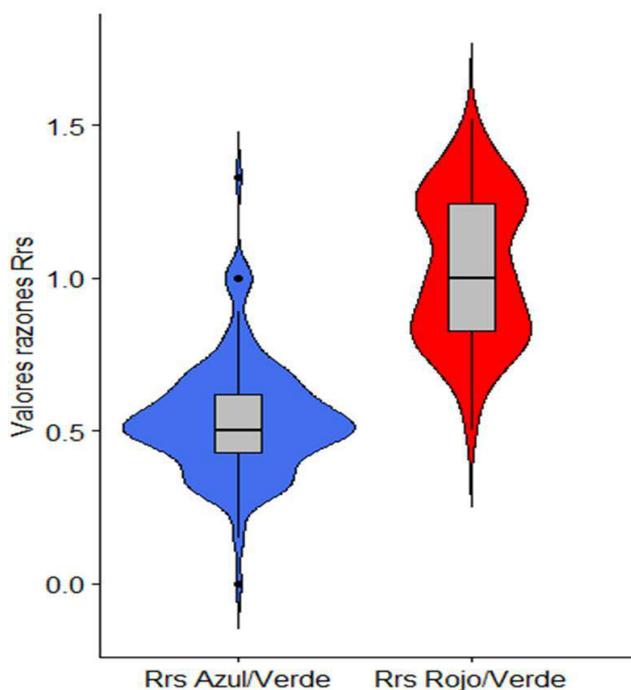


Fig. 54. Se muestran los valores del azul/verde y rojo/verde obtenidos en todos los muestreos. Las formas de las cajas representan el histograma de la variable (n=124).

Con los datos obtenidos se observó cómo se comportaron las razones a lo largo del año del muestreo. Las razones rojo/verde y azul/verde presentaron un gradiente que decrece en el verano austral y crece en el invierno austral (Fig. 55). Esta tendencia a decrecer en verano, que muestran las razones, fue inversa al comportamiento del biovolumen y de la clorofila-a (Tabla 11).

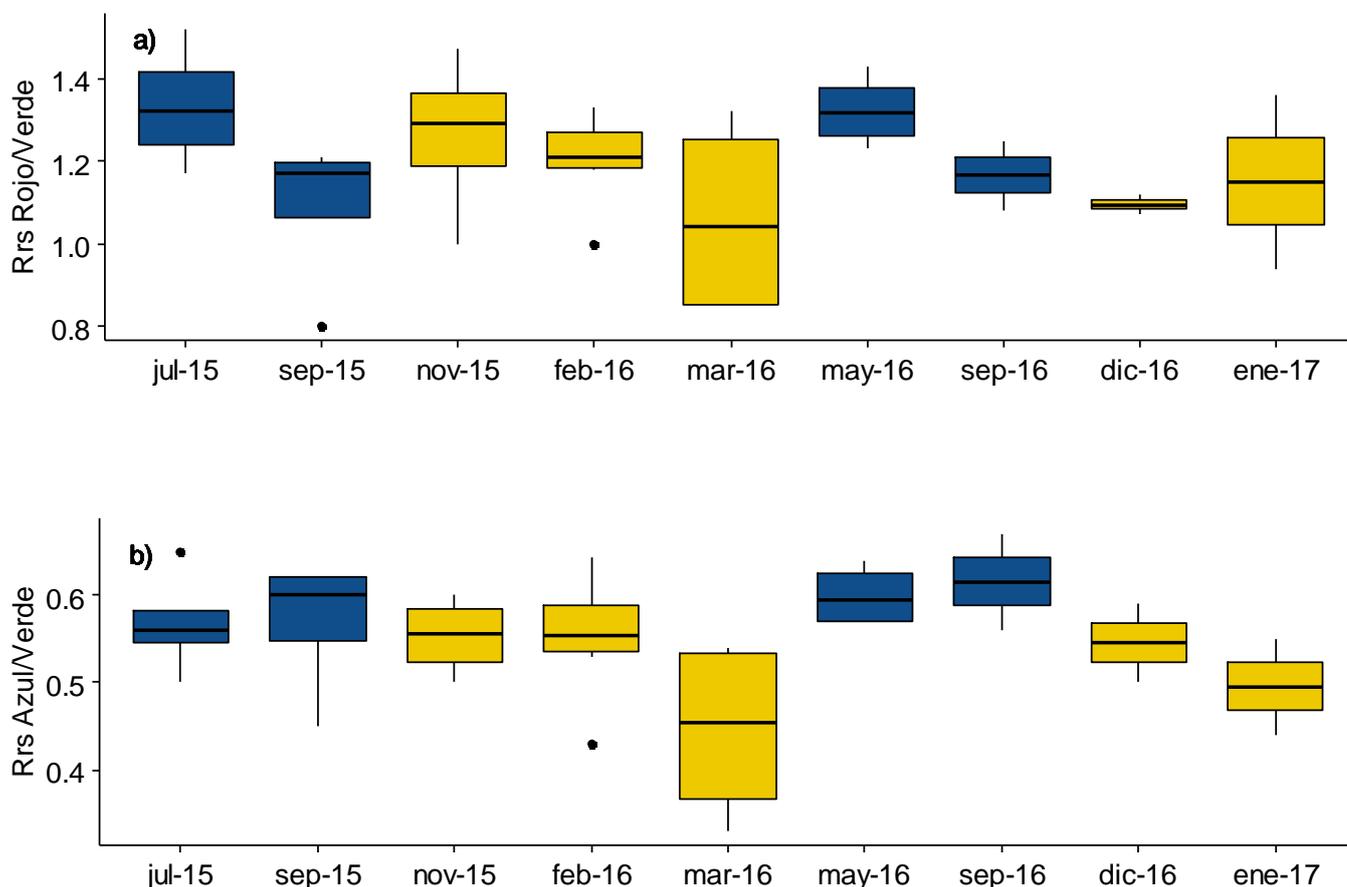


Fig. 55. Boxplot de la variación temporal de la razón rojo/verde (a) y azul/verde (b) y del logaritmo del biovolumen total por cada mes de muestreo y del logaritmo de la clorofila. El color azul corresponde a los meses de invierno y el dorado a los del verano, como se estableció en el capítulo 2.2 (n=30).

Calibración del sistema

Con respecto al primer ensayo se observó que en las curvas de calibración la banda verde y la turbidez disminuyeron linealmente con el número de colonias/ml. Según disminuyó el número de colonias por ml el valor del verde y de la turbidez del agua fue menor. (Fig. 56, 57; Anexo I).

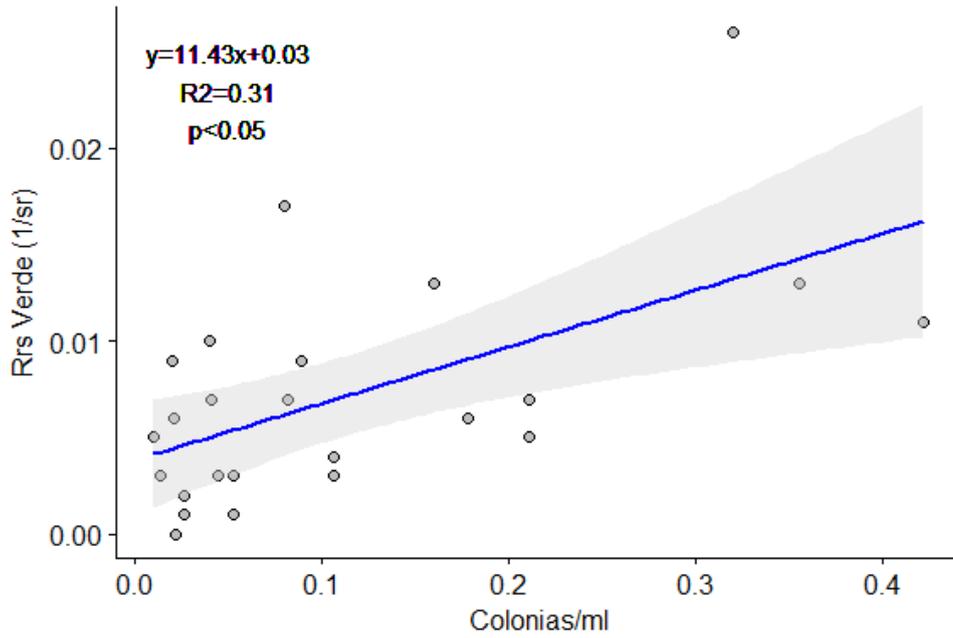


Fig. 56. Ajuste del modelo del Rrs en la banda verde con el número de colonia por ml. La línea azul es el ajuste del modelo y la sombra gris el intervalo de confianza.

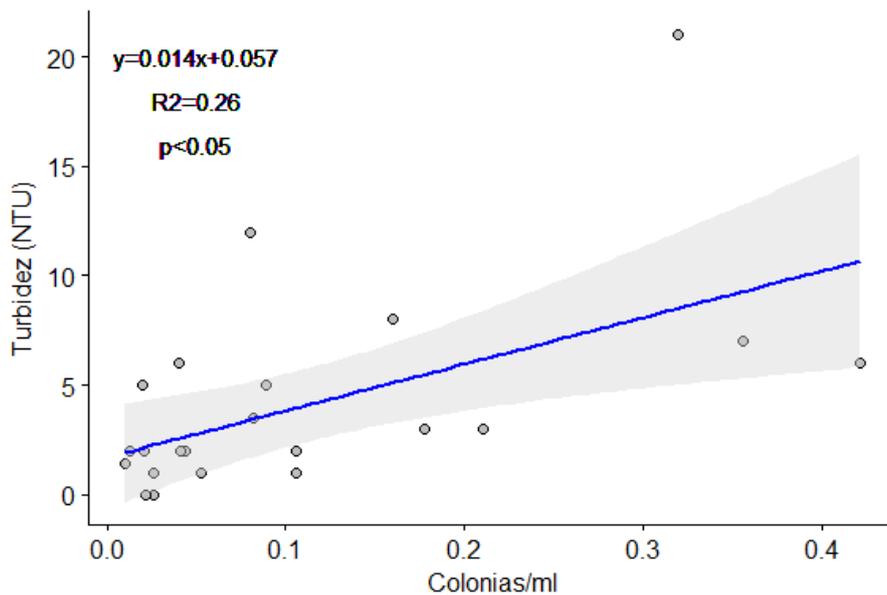


Fig. 57. Ajuste del modelo del Rrs de la turbidez medida con la app con el número de colonia por ml. La línea azul es el ajuste del modelo y la sombra gris el intervalo de confianza.

En relación al segundo ensayo, los valores obtenidos del R_{rs} de la razón rojo/verde y azul/verde tomados con el Hydrocolor en condiciones meteorológicas diferentes (Fig. 58) y variando la altura en la toma de fotos (Fig. 59) no mostraron diferencias significativas. La aplicación corrige mediante la luz proveniente del cielo en el valor del R_{rs} obtenido del agua y la altura no afecta mientras se mantenga la misma altura para las tres fotos.

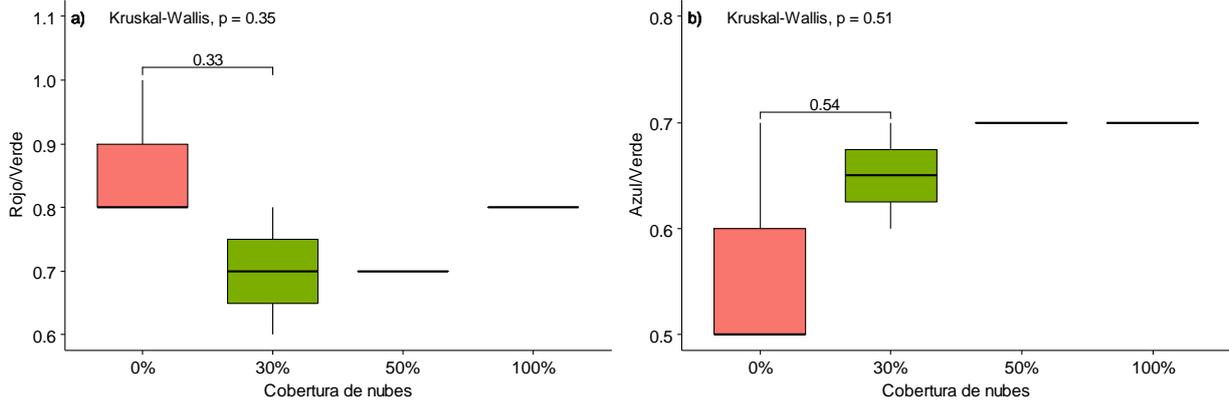


Fig. 58. Se muestra la variabilidad de la razón rojo/verde (a) y azul/verde (b) en el puerto de Rimouski con distintas condiciones meteorológicas (n=7).

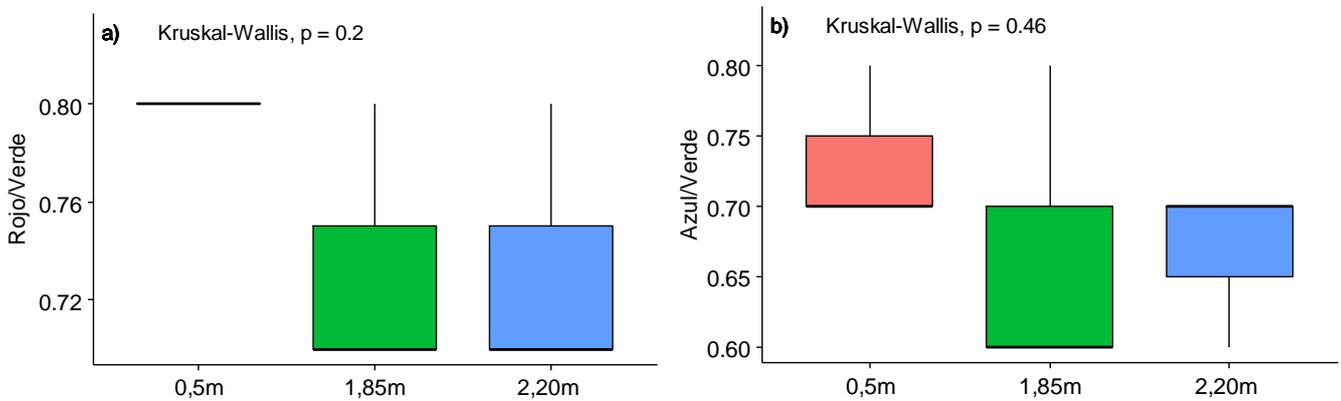


Fig. 59. Se muestra la variabilidad de la razón rojo/verde (a) y azul/verde (b) en el puerto de Rimouski a tres alturas diferentes 0.5, 1.85 y 2.20 m (n=9).

Por último, con respecto al tercer ensayo, los resultados de la comparación del valor del Rrs en cada banda entre la app y el radiómetro mostraron que no hubo diferencias significativas entre ambos instrumentos (Fig. 60). Tomando como ejemplo la banda verde, en el caso del radiómetro los valores de todos los R_{rs} oscilaron entre 0.006802, 0.006585, 0.007301 y 0.007841 y el valor de la aplicación fue ligeramente menor (0.06).

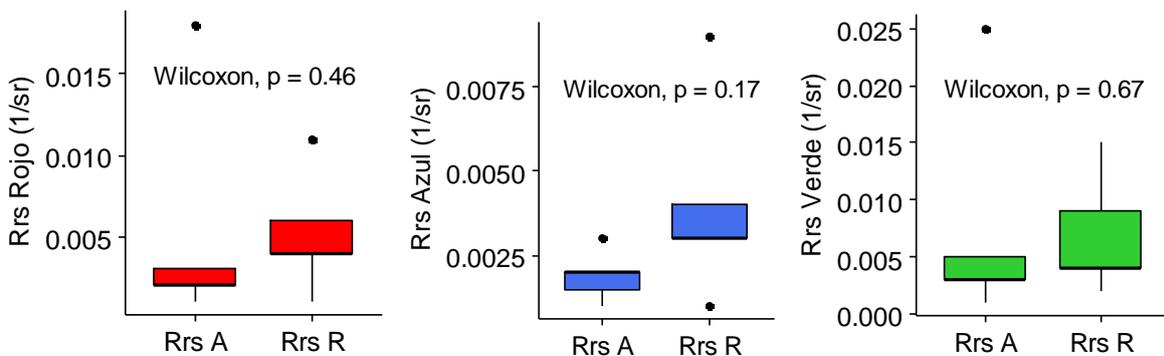


Fig. 60. Se muestran las bandas azul, roja y verde en la app del móvil (A) y en el radiómetro en miniatura (R) (n=6).

Hydrocolor como herramienta de detección del CMA

En relación a la utilidad de la aplicación para la detección de floraciones de CMA, se comprobó que la aplicación es capaz de detectar la presencia del CMA. En la fig. 61 se ve una diferencia en las medias cuando hay ausencia o presencia de CMA, tanto de colonias como de floración con la razón rojo/verde y solo con la presencia de floraciones con la razón azul/verde. El valor medido por la aplicación es diferente según las bandas, por lo que obtenemos un mayor valor de la razón rojo/verde y de la razón azul/verde ante la ausencia del CMA (Fig. 61; Tabla 11).

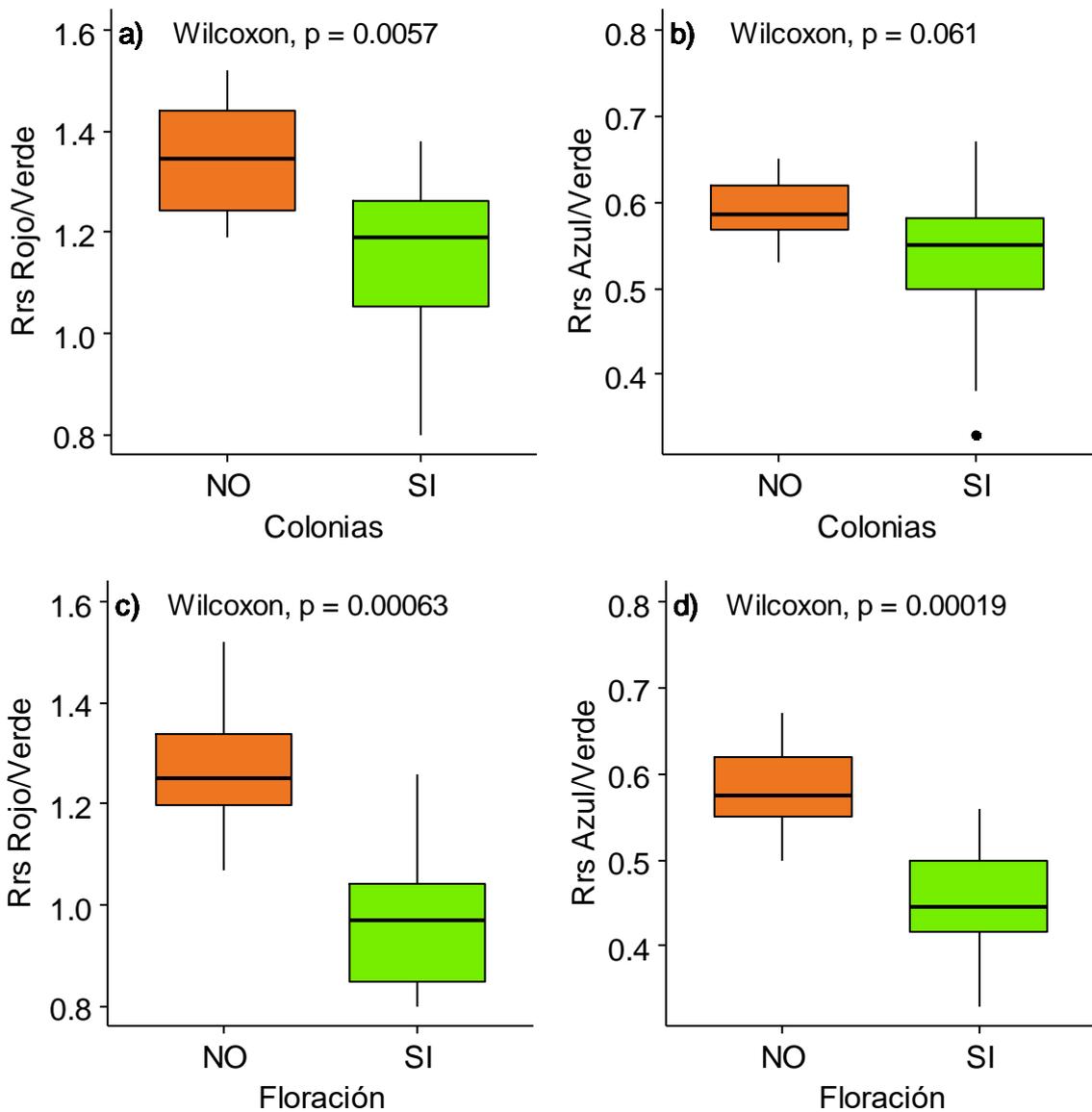


Fig. 61. Se muestran los valores medios y la variación de la razón Rrs rojo/verde (a y c) y Rrs azul/verde (b y d) con la presencia o no de colonias (a y b) y de floraciones (c y d) (n=32).

Relaciones entre indicadores biológicos e indicadores ópticos de los organismos del CMA

Cuando se analizó la relación entre los indicadores biológicos y los indicadores ópticos se observó que los indicadores biológicos, determinados mediante métodos de microscopía, se asociaron a los estimados mediante sensoramiento remoto. Se observó una relación lineal y negativa entre el biovolumen (total y fracciones) y la CI-a frente a la razón rojo/verde (Fig. 63) y a la razón azul/verde (Fig. 64) (Tabla 11).

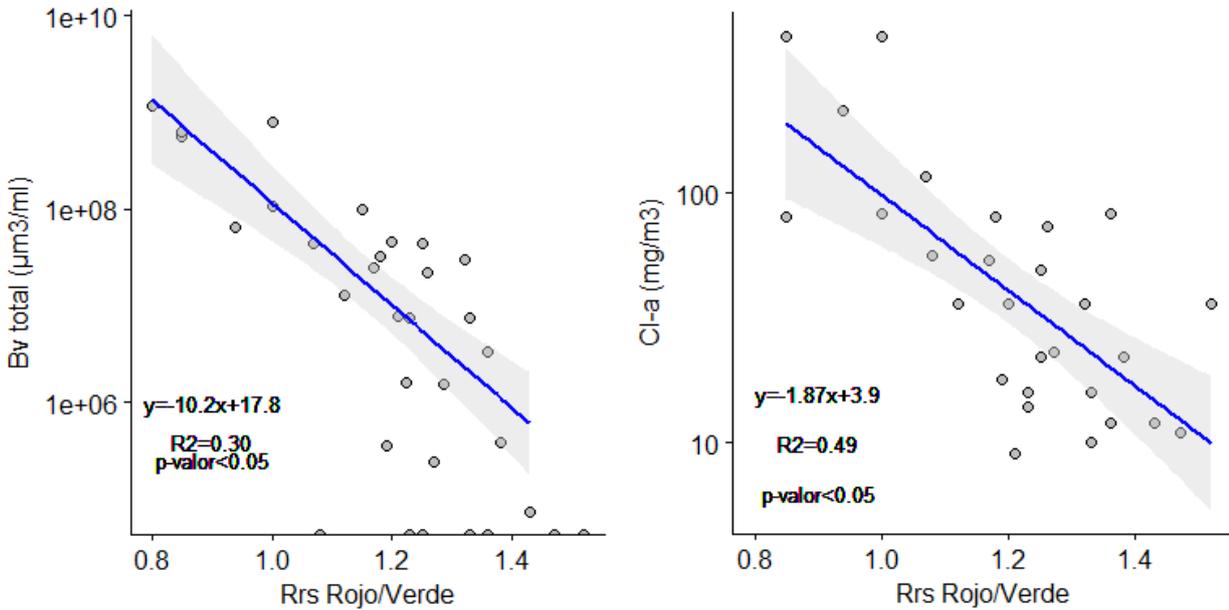


Fig. 63. Correlación de la razón rojo/verde con el Biovolumen (izquierda) y la CI-a (derecha). La línea azul es el ajuste del modelo y la sombra gris el intervalo de confianza. Los ejes y están en Log_{10} ($n=32$).

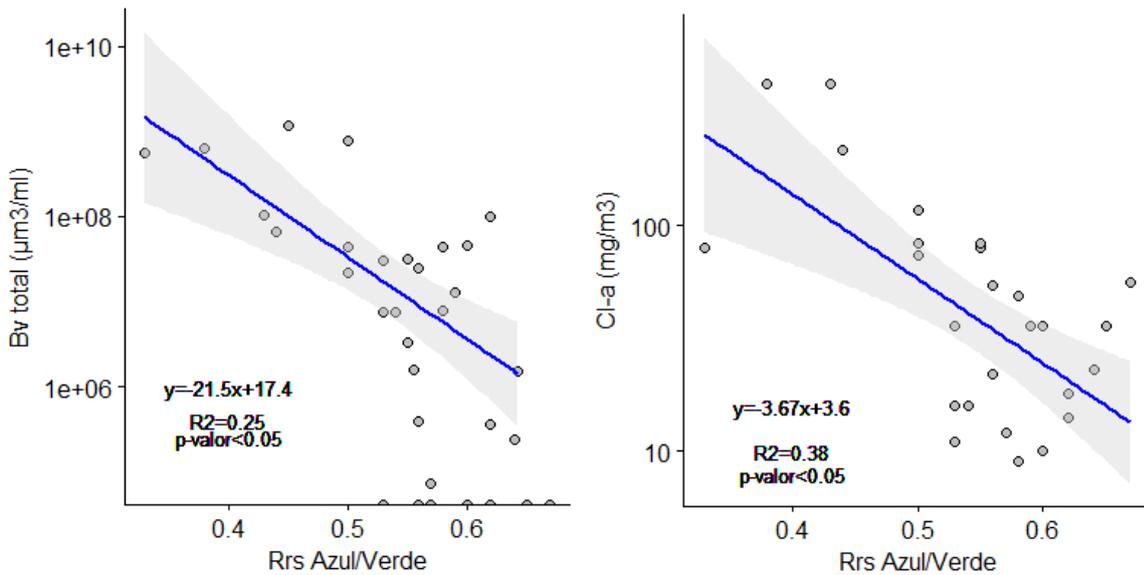


Fig. 64. Correlación de la razón azul/verde con el Biovolumen (izquierda) y la CI-a (derecha). La línea azul es el ajuste del modelo y la sombra gris el intervalo de confianza. Los ejes y están en Log_{10} ($n=32$).

Generación de modelos estadísticos

Una vez que se determinaron las relaciones entre las propiedades ópticas del agua y los indicadores biológicos se buscó explicar de los cambios observados en la abundancia de genotipos tóxicos mediante la generación de modelos matemáticos que contuvieran las variables ambientales y ópticas estudiadas y que caracterizan al CMA. En primer lugar el gráfico del modelo lineal entre el *mcyE* y la razón rojo/verde mostró que la recta de regresión fue la de un modelo segmentado (Fig. 65).

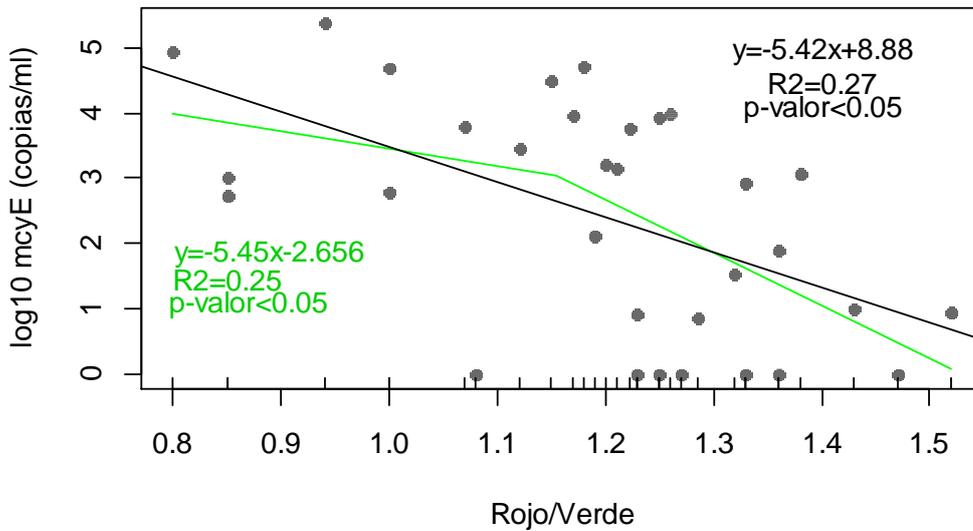


Fig. 65. Representación del modelo lineal de variable <<y>> log10 mcyE (copias/ml) y <<x>> la razón rojo/verde. La línea verde es el abline del modelo segmentado por el punto 1.2 y la línea negra es el abline del modelo lineal simple (n=32).

Después, los tres modelos testeados se hicieron solo para las muestras del embalse del Salto Grande (n=30) los cinco modelos establecieron que la variable que mejor explicó la abundancia de genotipos tóxicos fue la razón R_{rs} rojo/verde.

Con respecto a los modelos de regresión, el modelo de regresión lineal múltiple (rg), mediante el criterio del step AIC mostró que la abundancia de genotipos tóxicos se explica por la temperatura en positivo y el viento, la conductividad y la razón rojo/verde en negativo.

$$mcyE \text{ total} = 10.92 + 0.15 \text{ Temp} - 0.09 \text{ K} - 0.24 \text{ Viento} - 4.89 \text{ Rojo/Verde}$$

Este explicó un 53% de la varianza observada.

El segundo modelo de regresión, el CART, estableció que la variable que explicó la abundancia de genotipos tóxicos fue la razón rojo/verde con un valor de corte de 1,216 y explicó un 36% de la varianza. Por tanto, esto significa que a valores mayores a 1,216 tendremos una mayor probabilidad de tener menor abundancia de genotipos tóxicos (Fig. 66).

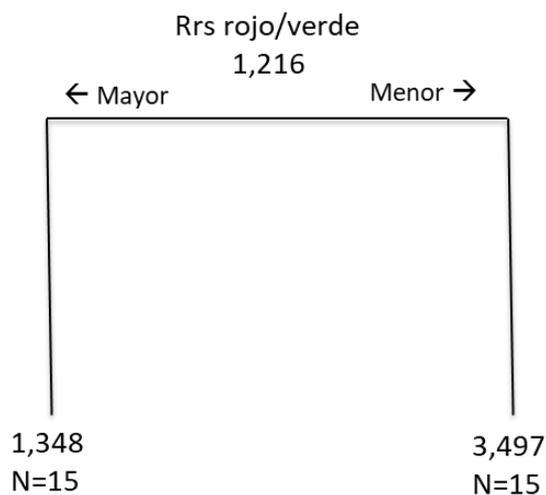


Fig. 66. CART de regresión máxima (sin poda). Valores de la razón rojo/verde mayores o menores de 1.216 cambian la abundancia de genotipos tóxicos.

Por el último el tercer modelo de regresión, el random forest (rf), también estableció que la razón rojo/verde fue la variable que explicó el mayor porcentaje de la varianza en la abundancia de genotipos tóxicos (Fig. 67).

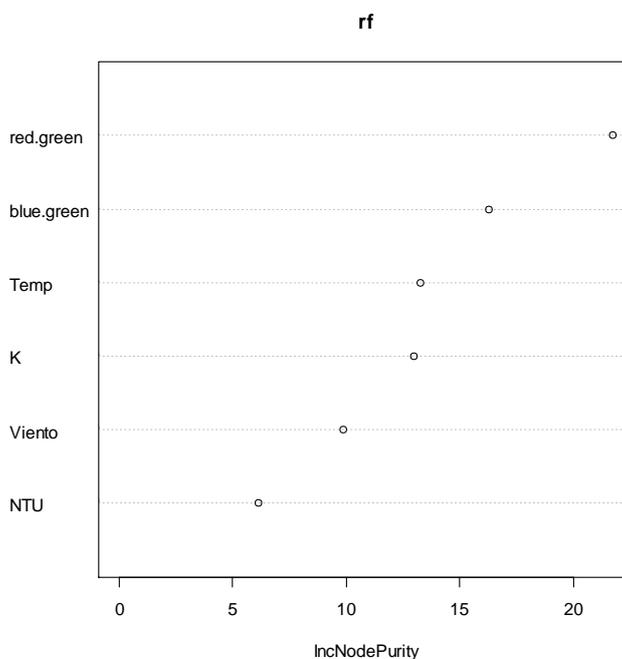


Fig. 67. Salida gráfica del modelo de Random forest donde se muestra la importancia de las variables en la explicación de la varianza de la variable y (mcyE). De tal manera que la primera variable explicaría un 22% de la varianza y así sucesivamente. NTU corresponde a la turbidez medida por la aplicación.

Para definir el mejor modelo se hizo una comparación de los errores de los tres modelos, lo que mostró que el CART fue el modelo con el menor error medio (Fig. 68).

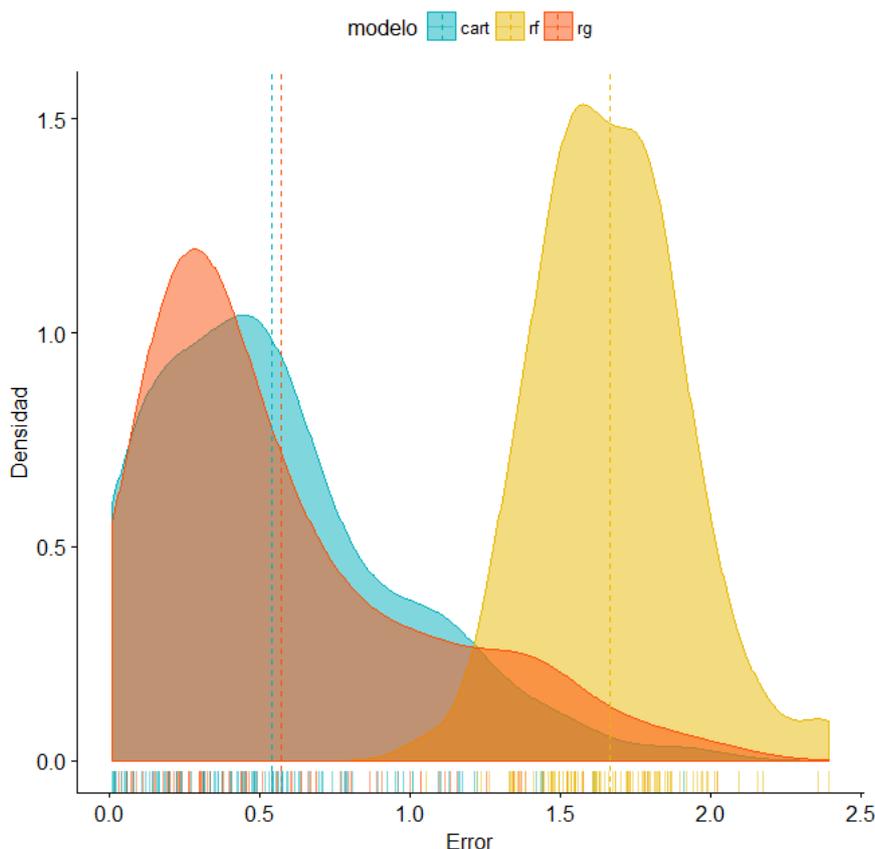


Fig. 68. Histograma donde se muestran los errores calculados en cada modelo mediante el método definido en materiales y métodos. Las líneas punteadas marcan la media de cada error. Azul es el modelo del CART, naranja el random forest (rf) y rosado la regresión lineal múltiple (rg).

Con respecto a los modelos categóricos (CART y Random Forest), el modelo más exacto y sensible fue el CART categórico, el cual mostró el valor del rojo/verde como la variable más relevante. Se marcó el valor de 1,216 como el límite para tener alta (A) o baja (B) abundancia de genotipos tóxicos. Cuando el valor de la razón rojo/verde es mayor 1.216 existe un bajo (B) riesgo de obtener altos valores de copias/ml del gen *mcyE* en la muestra y cuando es menor a 1.216 existe un alto (A) riesgo, lo que se traduce en una alta probabilidad de que la muestra sea tóxica (Fig. 69).

Los errores del modelo del CART se muestran en la matriz de confusión del modelo. Esta matriz estableció que el modelo tuvo un 76.6% de exactitud y un 73.3% de sensibilidad. Hubo tres que predijo A y era B (falso positivo) y hubo cuatro casos que predijo B y era A (falso negativo) (Tabla 13).

Tabla 13. Matriz de confusión del modelo del CART de clasificación. Las entradas maximizadas están resaltadas en negro. El falso negativo (subrayado) implica que el modelo detecta baja concentración de genotipos tóxicos cuando la abundancia es alta. N=30 muestras provenientes del embalse.

		Predichos	
		A	B
Observados	A	11	<u>4</u>
	B	3	12

En segundo lugar el random forest, que también marcó la razón rojo/verde como la variable de mayor importancia. Este modelo tuvo un error mayor que el CART, solo tuvo un 66% de exactitud y un 64% de sensibilidad. Hubo 5 casos que predijo A como B y otros 5 que predijo B como A (Tabla 14).

Tabla 14. Matriz de confusión del modelo random forest. Las entradas maximizadas están resaltadas en negro. El falso negativo (subrayado) implica que el modelo detecta baja concentración de genotipos tóxicos cuando la abundancia es alta. N=30 muestras provenientes del embalse.

		Predichos	
		A	B
Observados	A	9	<u>5</u>
	B	5	11

Resumiendo, se probaron 5 modelos: 3 modelos de regresión que fueron lineal múltiple, CART y rf y dos categóricos que fueron CART y rf. El modelo final fue el CART de clasificación, ya que se interpreta mejor que el de regresión y es más preciso que el rf categórico. Se caracterizando los sitios definidos por el modelo del CART en base a sus características biológicas (Bv, MLD y Cl-a), tóxicas (*mcyE*) y en base a sus características ambientales (Fig. 70).

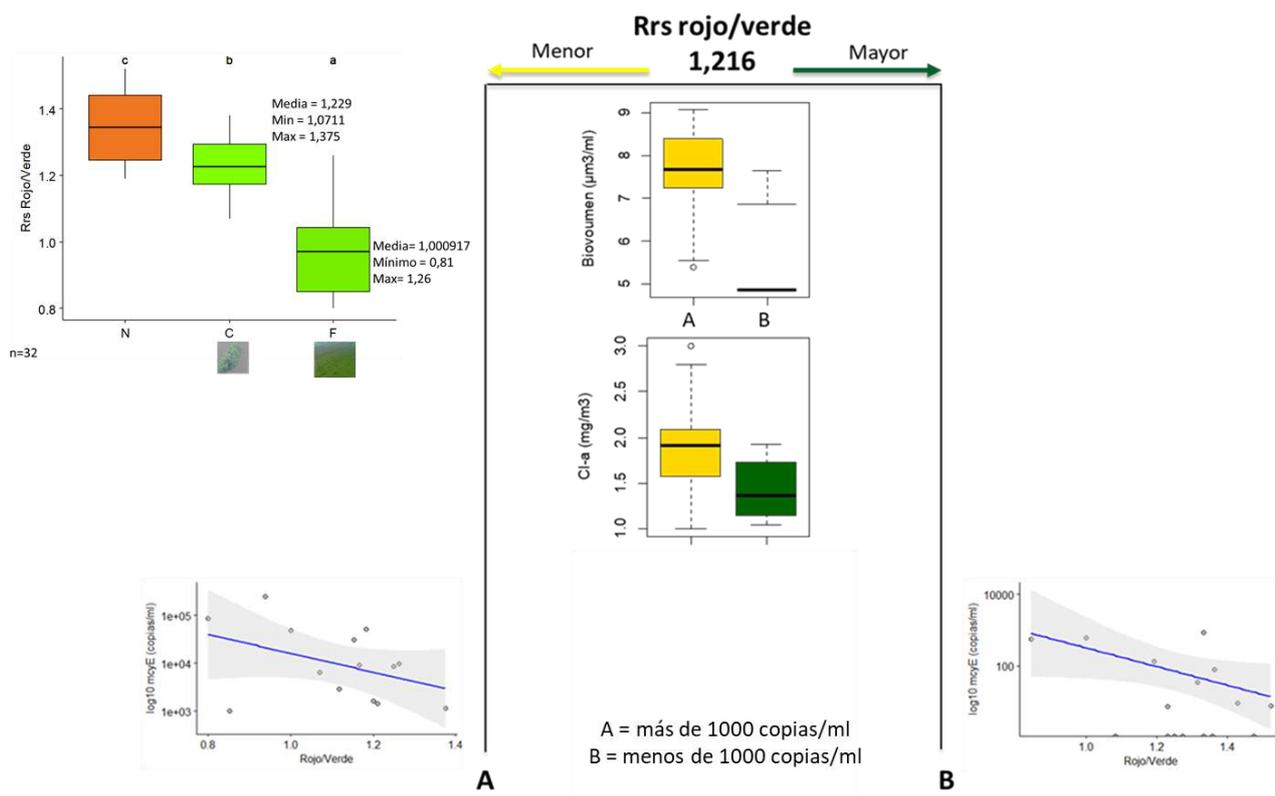


Fig. 69. CART categórico que expresa la distinción entre alta (A) y baja (B) probabilidad de encontrarse una floración con genotipos tóxicos. Cuando el valor de la razón rojo/verde es mayor 1.216 existe una baja probabilidad (B) y cuando es menor a 1.216 alta probabilidad (A). Se caracterizaron las variables biológicas en los dos boxplots y la relación entre la razón rojo/verde y el gen mcyE en los diagramas de puntos, según el criterio de A y B. Además se añade la gráfica del valor del Rrs rojo/verde frente a la presencia o ausencia de colonias y floraciones y sus valores medios, mínimos y máximos.

3.4. Discusión

Ecosistemas acuáticos como el embalse de la represa de Salto Grande requieren de una red de monitoreo adecuada y extendida en el tiempo y en el espacio (Drozd et al., 2014), para ello la aplicación del sensoramiento remoto es fundamental. Aunque el sistema de teledetección es útil y necesario, para los sitios de difícil acceso se necesitan de otras metodologías que complementen el trabajo de las imágenes satelitales de una manera micro, ya que para cumplir con los requerimientos de las políticas en la calidad del agua es necesaria la implementación de nuevas tecnologías que brinden información precisa y en tiempo real (Chorus, 2012). En los últimos años ha aumentado el interés por usar las cámaras digitales como un método de sensoramiento remoto micro, simple y de bajo costo, pero tecnológicamente sofisticado (White, Fieighery, Bowers, O'riain, y Bower, 2005; Goddijn y White 2006). Dado que el R_{rs} está relacionado con las propiedades ópticas (reflectancia y absorción) del agua, las aproximaciones ópticas de la ecuación 1 ($R_{rs} = L_w/E_d$) se han utilizado en estudios anteriores en el desarrollo de modelos bio-ópticos para la obtención de la cl-a superficial en aguas oceánicas mediante sensoramiento remoto (Blondeau-Patissier et al., 2014). Hoy en día es posible conocer con buena exactitud la concentración de los pigmentos del fitoplancton a través de los valores del R_{rs} (Soja-Woźniak et al., 2017; Woźniak et al., 2016).

La novedad aportada en este trabajo es la aplicación de la ecuación 1 en cuerpos de agua dulce y la incorporación de la relación entre las propiedades ópticas y la abundancia de genotipos tóxicos. En este sentido, nuestros resultados reflejaron una buena caracterización de la aplicación del teléfono móvil utilizada, por lo que se puede afirmar que el empleo de la aplicación Hydrocolor a sistemas de agua dulce permite la detección de colonias y/o floraciones del CMA de manera significativa frente a la ausencia de las mismas. Además, dicha aplicación es capaz de estimar si la población del cuerpo de agua tendrá alta o baja abundancia de genotipos tóxicos. Las cámaras de móvil pueden usarse fácilmente en los barcos, además Hydrocolor mejoró el método, frente a las cámaras digitales usadas en la literatura, ya que en el análisis de las fotos ya está incorporada la reducción de la interferencia de la reflectancia del cielo. La reflectancia de la luz en el agua está directamente relacionada con la cantidad y el tipo de sustancias suspendidas y disueltas en el agua. Un incremento de la turbidez del agua causará un aumento en la dispersión de la luz e incrementará la reflectancia total del agua. Las partículas que contienen pigmentos, como el CMA, absorberán la luz en regiones específicas del espectro visible (Wojtasiewicz y Stoń-Egiert, 2016). Es por ello que a medida que el biovolumen del

CMA aumentó se obtuvo una mayor reflectancia en la banda verde, lo que proporcionó una disminución del valor de las razones rojo/verde y azul/verde (por una mayor absorción en el rojo y en el azul). El sensoramiento remoto del agua dulce puede considerarse útil solo para la estimación de los parámetros de la calidad del agua en la parte alta de la columna de agua. El 90% de la luz que refleja un cuerpo de agua proviene dentro de la profundidad que se pueda calcular como $1/K_d$ (Kirk 1994). En nuestro trabajo el rango fue de 0.1 a 0.3 m dependiendo de la profundidad del sitio de muestreo. Esto significa que la mayor parte de la luz reflejada era de la parte más alta de la columna del agua, no hubo problemas con la influencia de la reflexión del suelo y nuestros resultados son aplicables a las comunidades del CMA que se acumulan en la superficie del cuerpo de agua dulce. El modelo elegido fue el CART categórico y se estableció de forma preliminar el valor R_{rs} rojo/verde de 1.216 como valor guía a la hora de establecer el potencial tóxico. Cuando se obtenga un valor menor a 1.216 será probable que la comunidad del CMA en el cuerpo de agua tenga una alta abundancia de genotipos tóxicos (a excepción del valor 1,00 que corresponde al agua pura) y a valores mayores de 1,216 habrá una baja probabilidad de que la población sea tóxica. Este modelo obtuvo una precisión del 76%.

Las floraciones masivas de cianobacterias ocurren todos los veranos a nivel mundial donde el CMA es, por lejos, la cianobacteria que más aparece en las reservas de agua dulce (Harke et al., 2016). Como se mostró en la figura 4, floraciones provenientes de este género se reportaron en 173 países, por lo que el método desarrollado en esta tesis tendría una gran aplicabilidad. Existe una alta diversidad entre especies tanto en el rango de absorción de la luz como en la composición de pigmentos. Ese amplio rango de concentración de pigmentos entre diferentes especies indica diferentes mecanismos de foto-aclimatación (Wojtasiewicz y Stoń-Egiert, 2016). Los valores en los que el CMA absorbe la luz en la franja azul son específicos para este género y la franja de reflectancia de los valores de las razones son específicos para el CMA (Wojtasiewicz y Stramski, 2010; Quibell, 1992), la firma espectral es intrínseca a cada género, lo que reduce la obtención de falsos positivos en cuerpos de agua con una comunidad diferente al CMA.

La importancia de la presente tesis radica en su potencial aplicabilidad tanto en el sistema de monitoreo de las autoridades competentes como en la creación de una red de monitoreo ciudadana. Además, trabajar con una aplicación de celular permite que sea de fácil acceso para el público en general por lo que la producción de un gran set de datos es plausible. La principal limitación en la aplicación de métodos basados en la óptica para la detección de especies de fitoplancton es la falta de información en la variabilidad de las POIs en muestras naturales (Wojtasiewicz y Stoń-Egiert, 2016), información que se aporta en este trabajo al generar un modelo estadístico mediante la toma de muestras naturales y no a través de ensayos en el laboratorio. El sensoramiento ciudadano se ha aplicado a la hidrología, por ejemplo Olmanson, Bauer y Brezonik (2008) usaron medidas ciudadanas del disco de Secchi como datos *in-situ* en la calibración de imágenes satelitales; Sunyoung, Robson, Zimmerman, Pierce y Haber (2011) desarrollaron una aplicación de móvil (Creek Watch) para que los ciudadanos monitorearan el canal de agua (la tasa de flujo y la cantidad de litros); Toivanen, Koponen, Kotovirta, Molinier y Chengyuan (2013) presentaron un método para observar la profundidad Secchi y la turbidez usando un artilugio y una cámara de móvil y Leeuw y Boss (2014) desarrollaron la aplicación HydroColor para estimar la concentración total de materia suspendida y el coeficiente de retro dispersión en base a la reflectancia del agua medida con la cámara de un móvil. Además, la agencia de medioambiente europea publicó la aplicación Marine LitterWatch (http://www.eea.europa.eu/themes/coast_sea/marine-litterwatch) en 2013 para involucrar a los ciudadanos en el monitoreo de la distribución y composición marina en el marco de la Directiva Marco de la Estrategia Marina.

El método propuesto en esta tesis es innovador y puede favorecer la elaboración de sistemas de alertas de cianobacterias basados en la detección de floraciones tóxicas en Uruguay. En esta tesis se utilizó la reflectancia de la luz, reflejada por las comunidades del CMA, obtenida a través de una aplicación de teléfono móvil como bio-indicador del agua dulce. Otros trabajos han propuesto sistemas de alertas basados en otros bio-indicadores alternativos como la medición de la fluorescencia (Cremella et al., 2017), que podrían ser utilizados como complemento a la aplicación de nuestro modelo. La ventaja de nuestro proyecto radica en el uso de aplicaciones de teléfonos móviles para un monitoreo rápido y preliminar y además nuestro proyecto incorpora la variable potencial tóxico en la aplicación de estas metodologías lo que no se había contemplado con anterioridad.

Capítulo 4

4.1. Consideraciones finales

Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que existe una relación entre la morfología (tamaño y presencia de mucílago) y la toxicidad en las colonias del CMA, ya que se observó una diferencia en la abundancia de genotipos tóxicos (copias *mcyE*/ml) y en la concentración de microcistinas entre las distintas fracciones de tamaño. De acuerdo a lo observado, las colonias que aquí denominamos de tamaño medio (60-150 μm) se encontrarían en fase de crecimiento exponencial y estarían produciendo toxinas activamente. Por otro lado, las altas temperaturas favorecerían a los organismos del CMA unicelulares y no tóxicos. Al estudiar más en profundidad las diferencias entre las colonias de distintas fracciones de tamaño mediante el análisis de diversidad genética del gen *mcyJ* (empleado como indicador de la variabilidad genotípica de las poblaciones del CMA), se distinguieron dos genotipos separados en base al tamaño de las colonias, con un valor de corte en 60 μm . Esto implica que aquellos organismos del CMA cuya MLD es mayor a 60 μm tendrían un genotipo determinado y pertenecerían a una población genéticamente relacionada, mientras que los menores a ese valor constituirían otro genotipo. Asimismo, estas diferencias genotípicas fueron especialmente notorias durante los periodos de floración (diciembre-marzo), cuando las problemáticas ambientales son más relevantes. En este contexto, se sugiere que la alta abundancia de organismos con MLD mayor a 60 μm sería un indicador de la presencia de floraciones potencialmente tóxicas en los cuerpos de agua.

El hallazgo de la relación entre la morfología y la toxicidad potencial del CMA y entre dicha relación y las propiedades ópticas del agua nos permitiría predecir la toxicidad de las floraciones en términos de presencia de genotipos tóxicos. Las colonias mayores a 60 μm de la MLD se concentrarían en la superficie del agua por lo que reciben una mayor luz solar y aumentan los valores de la reflectividad de la luz que pueden ser registrados por el sensoramiento remoto.

Como se mencionó anteriormente, el monitoreo de cianobacterias requiere de métodos rápidos, simples, de bajo costo y fiables por lo que los resultados de esta tesis muestran el potencial de las imágenes derivadas de los teléfonos móviles para predecir la posible toxicidad de las floraciones del CMA. La fotografía digital constituiría un método efectivo y de bajo costo para detectar la abundancia de genotipos tóxicos presente en los cuerpos de agua. De esta manera, se ampliaría el conocimiento aplicable a la gestión de la calidad del agua con un método complementario a la metodología ya

existente (fluorescencia y fotografía satelital). Nuestros resultados constituyen un primer paso en el desarrollo de algoritmos regionales específicos para detectar organismos del CMA mediante el uso del sensoramiento remoto basado en el valor de la razón rojo/verde de la reflectancia del agua. Así, si al tomar la fotografía empleando una aplicación tal como Hydrocolor el usuario obtuviera un valor menor a 1.216 implicaría que la comunidad del CMA en el cuerpo de agua estaría compuesta por una alta abundancia de genotipos tóxicos, mientras que valores mayores de 1,216 indicarían una baja abundancia de células tóxicas del CMA. Más aún, proponemos que esta metodología podría aplicarse a otros sistemas de agua dulce con características abióticas similares a las mencionadas en este trabajo.

El sensoramiento mediante aplicaciones de teléfonos móviles podría extenderse a la red de sensores de las instituciones gubernamentales (OTE, DINAMA, DINARA, CTM, CARU) para poder producir información in-situ y rápida para el conocimiento y predicción de los eventos de floraciones de cianobacterias y para mejorar el modelo propuesto en nuestra tesis. Por ejemplo, la repartición de cartas de grises entre el cuerpo de guardavida, en la ciudad de Montevideo, ayudaría al guardavida en la decisión de poner la bandera sanitaria.

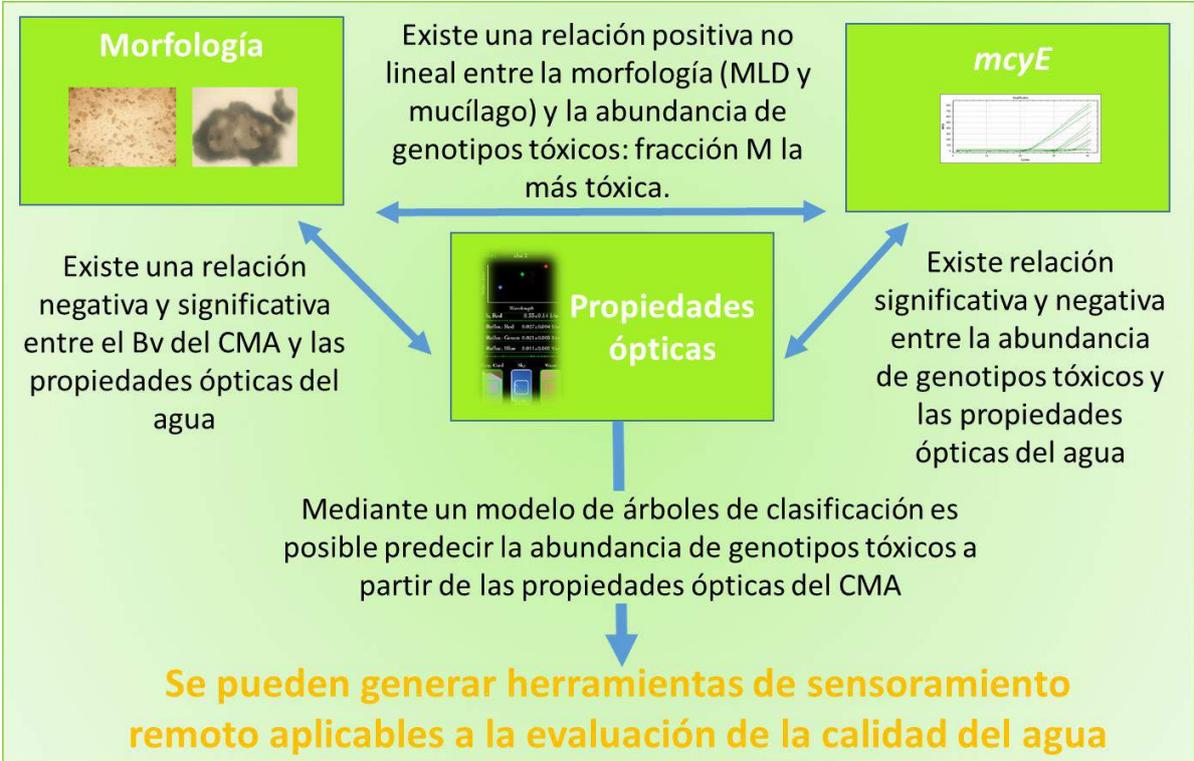


Fig. 70. Esquemas que responde las preguntas planteadas al principio de la tesis.

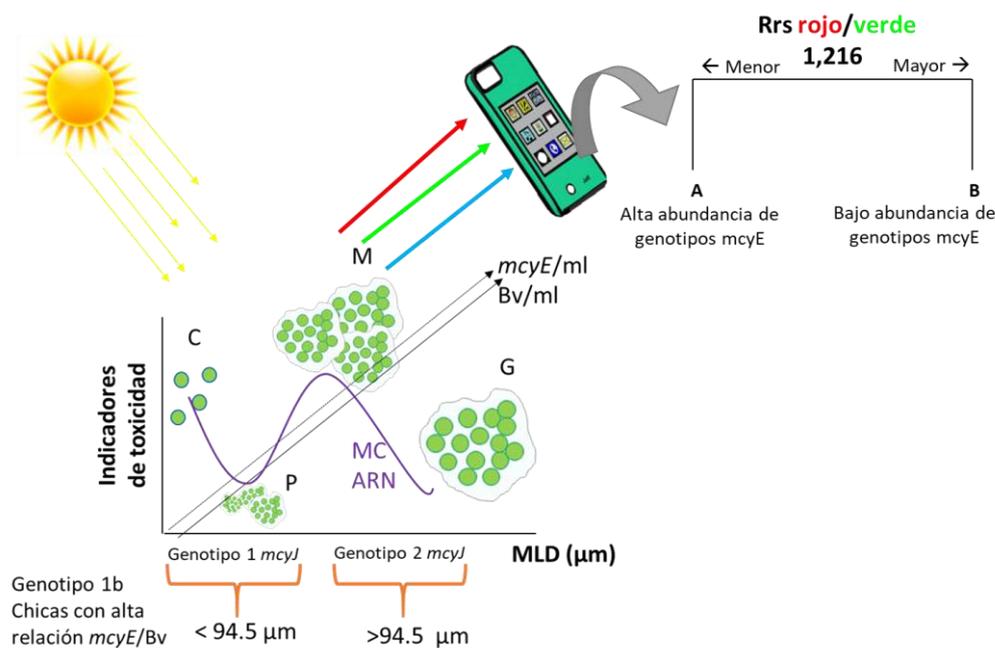


Fig. 71. Diagrama conceptual resumen de la tesis

4.3. Perspectivas

El presente trabajo de tesis abre diversas perspectivas en torno al análisis de la relación de tres propiedades del CMA que hasta el momento habían sido estudiadas por separado. Con respecto a la relación entre morfología y toxicidad una posible línea de acción podría radicar en profundizar el análisis genético y de diversidad de los diferentes tamaños coloniales, sumándole el conteo del número de células para poder estudiar el efecto del mucílago en los resultados. Sería asimismo interesante estudiar el comportamiento de las distintas fracciones mediante varios muestreos diarios en una semana para poder ver el comportamiento de la población en el corto plazo y conocer el intervalo del tiempo necesario para que se exprese y produzca la toxina. Con respecto a la relación entre toxicidad y propiedades ópticas serían necesarios más muestreos para aumentar el número de casos y mejorar el poder predictivo del modelo. Además, sería interesante generar una serie temporal de muestreos en sistemas estuarinos o marinos para conocer la influencia de la conductividad en la morfología de los organismos, su relación con la toxicidad y con la capacidad de evaluación utilizando sensoramiento remoto. Por último, sería interesante ampliar los resultados del modelo con el fin de incluir otras especies de cianobacterias productoras de toxinas y evaluar la capacidad de discernir floraciones formadas por distintas especies con distintas toxinas a través de las propiedades ópticas.

Referencias bibliográficas

- Aguirre-Gómez, R., Weeks, A.R., Boxall, S.R. (2001). The identification of phytoplankton pigments from absorption spectra. *Int. J. Remote Sens.* 22 (2-3), 315-338.
- Alcántara, I. 2015. *Efectos de la variabilidad ambiental sobre la presencia, estructura comunitaria y floraciones del Complejo Microcystis aeruginosa*. Tesina de Grado- Licenciatura en Cs. Biológicas. Facultad de Ciencias-Universidad de la Republica, Montevideo.
- Alonso C., Villén L., Martín D., Conde L., Alonso A.M., González M.E., Verdugo M. y Avilés J. (2008). Problemas de las cianobacterias en aguas de recreo y aguas de consumo. *Ingeniería Civil* 151/2008.
- Amé, M., Wunderlin, D. (2005). Effects of iron, ammonium and temperature on microcystin content by a natural concentrated *Microcystis aeruginosa* population. *Water Air Soil Pollut.* 168 (1-4), 235-248.
- Arment, A. R., and Carmichael, W. W. (1996). Evidence that microcystin is a thio-template product. *J. Phycol.* 32:591-597.
- Aubriot L, Conde D, Bonilla S, Hein V, Brito A. (2005). Vulnerabilidad de una laguna costera reserva de Biósfera: indicios recientes de eutrofización. Pages 65-87 in JVPIPK, ed. Taller Internacional de *Eutrofización y Embalses CYTED VXII B. Santiago de Chile*: Patagonia Impresores.
- Barocio-Leon O. (2006). *Variabilidad espacial y temporal del coeficiente de absorción y pigmentos del fitoplancton en la Corriente de California*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Marinas, UABC. 174 pp.
- Barford, D. (1996) Molecular Mechanisms of the Protein Serine Threonine Phosphatases. *Trends in Biochemical Sciences* 21: 407-412.
- Beckett, A. (2005). *Measuring water colour with digital photography*. M.Sc. thesis, Bangor University, UK.
- Becker, R. A., Chambers, J. M. and Wilks, A. R. (1988) *The New S Language*. Wadsworth & Brooks/Cole.
- Bishop, C.T., Anet, E.F.L.J., Gorham, P.R. (1959). Isolation and identification of the fast death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1), 453-471.
- Blondeau-Patissier, D., Gower, J. F., Dekker, A. G., Phinn, S. R., & Brando, V. E. (2014). A review of ocean color remote sensing methods and statistical techniques for the detection, mapping and analysis of phytoplankton blooms in coastal and open oceans. *Progress in oceanography*, 123, 123-144.
- Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., De León, L., Brena, B., M., Pérez, M., Piccini, C., Martínez de la Escalera, G., Chalar, G., González-Piana, M., Martigani, F., Aubriot, L. (2015). Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. *Innotec*, (10 ene-dic), 9-22.
- Bonilla S. (2009). *Cianobacterias. Manual para Identificación y Monitoreo*: Unesco.
- Bordet, F., Fontanarrosa, M. S., & O'Farrell, I. (2017). Influence of light and mixing regime on bloom-forming phytoplankton in a subtropical reservoir. *River Research and Applications*, 33(8), 1315-1326.
- Brena, B. (2009). Producción de toxinas y otros metabolitos In Bonilla S (ed), Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Parte I—Generalidades. *Documento técnico del PHI-VII No*, 16-18.
- Breiman L., Friedman J. H., Olshen R. A., and Stone, C. J. (1984) Classification and Regression Trees. Wadsworth.
- Bricaud A, Claustre H, Ras J, Oubelkheir K. (2004). Natural variability of phytoplanktonic absorption in oceanic waters: Influence of the size structure of algal populations. *J. Geophys.*
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., (2002). Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach, 2nd ed. ed. *Springer*, New York.
- Calle, M. L., & Sánchez-Espigares, J. A. (2007). Árboles de clasificación y regresión en la investigación biomédica. *Medicina clínica*, 129(18), 702-706.
- Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, 72(6), 445-459.
- Carr, N.G., Whitton, B.A. (1982). *The Biology of Cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Chalar G. (2009). The use of phytoplankton patterns of diversity for algal bloom management. En: *Limnologica*, 39: 200-208. De León, L., & Chalar, G. (2003). Abundancia y diversidad del fitoplancton en el Embalse de Salto Grande (Argentina-Uruguay). Ciclo estacional y distribución espacial. *Limnetica*, 22(1-2), 103-113.
- Chalar, G., De León L., Brugnoli E., Clemente J. & Paradiso M. (2002). Antecedentes y nuevos aportes al conocimiento de la estructura y dinámica del Embalse Salto Grande. El Agua en Sudamérica: de la Limnología a la Gestión en Sudamérica. In *Fernández Cirelli, A. & G. Chalar* (eds), Aprovechamiento y Gestión de los recursos hídricos. CYTED, Buenos Aires: 123-142.
- Chorus, I. (Ed.). (2012). *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*. Springer Science & Business Media.

- Chorus, I. (Ed.). (2005). Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries. Fed. Environmental Agency.
- Chorus, I., & Bartram, J. (1999). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.
- Ciotti A., Lewis M., and Cullen J. (2002). Assessment of the relationships between dominant cell size in natural phytoplankton communities and the spectral shape of the absorption coefficient. *Limnol. Oceanogr.*, 47(2), 404–417.
- Cohen, P. and Cohen, P.T.W. (1989) Protein Phosphatases Come of Age. *Journal of Biological Chemistry* 264: 21435-21438.
- Conde Scalone, D. N., Arocena Real de Azúa, R., & Rodríguez-Gallego, L. (2002). *Recursos acuáticos superficiales de Uruguay: ambientes, problemáticas y desafíos para la gestión* (No. DOC 0688).
- Comision Técnica Mixta de Salto Grande (CTM-SG) (1986). Dpto. Ecología. Calidad de Aguas: Caracterización limnológica del Embalse de Salto Grande. Mayo 1982 - Mayo 1985.
- Cremella B. (2017). *Puesta a punto y validación de un método basado en la fluorescencia in vivo de pigmentos como indicador de biomasa de fitoplancton y cianobacterias en cuerpos de agua de Uruguay*. Tesis de Maestría en Cs. Biotecnología. Facultad de Ciencias-Universidad de la Republica, Montevideo.
- CTM-SG (1983). Programa de desarrollo ambiental. Informe final. CTM-PNUMA, Proy. N° FP/100-78-02 (1326) 467pp.
- CTM-SG (1982). Evaluación de resultados de la aplicación del Programa Calidad de Aguas en el período julio 1976-abril 1981.
- De Leon L., Yunes, J.S. (2001). First report of Microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environmental Toxicology* 16, 110-112.
- Dekker A. G., T. J. Malthus, L. M. Goddijn, 1992, Monitoring cyanobacteria in eutrophic waters using airborne imaging spectroscopy and multispectral remote sensing systems, Proc. 6th Australasian Remote Sensing Conf., 1, 204 – 21
- DeMott, W. R., Zhang, Q. X., and Carmichael, W. W. (1991). Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* 36:1346–1357.
- DINAMA. (2009). Floración de Cianobacterias del río Uruguay el 4 de febrero de 2009 Montevideo: MVOTMA.
- Downing, T.G., Meyer, C., Gehringer, M.M., van de Venter, M. (2005). Microcystin content of *Microcystis aeruginosa* is modulated by nitrogen uptake rate relative to specific growth rate or carbon fixation rate. *Environ. Toxicol.* 20 (3), 257–262.
- Drozd, A. A., Ibáñez, G., Bordet, F., & Torrusio, S. E. (2014). Remote Sensing of chlorophyll in Salto Grande waters using hyperspectral resolution spectrometer, SPOT-4 (HRVIR) and Landsat-7 ETM+ data. <http://www.researchgate.net/publication/268511944>.
- Falconer, I., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M., Codd, G. (1999). Safe levels and safe practices. *Toxic Cyanobacteria in Water*. E & FN Spon, London, pp. 155–178.
- Falconer I.R. (1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria, *Environmental Toxicology and Water Quality* 6 (2) 177– 184.
- Falkowski PG, Raven JA. (1997). *Aquatic photosynthesis*. Princeton University Press, Massachusetts, USA. pp. 375.
- Fleming L.E., River C., Burns J., Williams C., Bean J.A., Shea K.A., Stinn J. (2002). Blue green algal (cyanobacterial) toxins, surface drinking water, and liver cancer in Florida, *Harmful Algae* 1 (2) 157–168.
- García-Consuegra B. (2012). Problemática en la clasificación de imágenes de satélite Landsat. https://previa.uclm.es/ab/educacion/ensayos/pdf/revista12/12_22.pdf.
- Gan, N., Xiao, Y., Zhu, L., Wu, Z., Liu, J., Hu, C., & Song, L. (2012). The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. *Environmental Microbiology*, 14(3), 730-742.
- Ganf, G. G., Oliver, R. L., & Walsby, A. E. (1989). Optical properties of gas-vacuolate cells and colonies of *Microcystis* in relation to light attenuation in a turbid, stratified reservoir (Mount Bold Reservoir, South Australia). *Marine and Freshwater Research*, 40(6), 595-611.
- Ginn, H.P., Pearson, L.A., Neilan, B.A. (2010). NtcA from *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 is autoregulatory and binds to the microcystin promoter. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (13), 4362–4368.
- Goddijn-Murphy, L., Dailloux, D., White, M., & Bowers, D. (2009). Fundamentals of in situ digital camera methodology for water quality monitoring of coast and ocean. *Sensors*, 9(7), 5825-5843.
- Goddijn, L. M., & White, M. (2006). Using a digital camera for water quality measurements in Galway Bay. *Estuarine, coastal and shelf science*, 66(3), 429-436.
- Graham, J. L., & Jones, J. R. (2007). Microcystin distribution in physical size class separations of natural plankton communities. *Lake and Reservoir Management*, 23(2), 161-168.
- Harada, K.-I., Tsuji, K. (1998). Persistence and decomposition of hepatotoxic microcystins produced by cyanobacteria in natural environment. *J. Toxicol., Toxin Rev.* 17, 385– 403.
- Harada, K.-I., Tsuji, K., Watanabe, M.F., Kondo, F. (1996). Stability of microcystins from cyanobacteria: III. Effect of pH and temperature. *Phycologia* 35, 83– 88.

- Harke, M. J., Steffen, M. M., Gobler, C. J., Otten, T. G., Wilhelm, S. W., Wood, S. A., & Paerl, H. W. (2016). A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis spp.* *Harmful Algae*, 54, 4-20.
- Harke, M.J., Gobler, C.J. (2013). Global transcriptional responses of the toxic cyano-bacterium, *Microcystis aeruginosa*, to nitrogen stress, phosphorus stress, and growth on organic matter. *PLoS ONE* 8 (7), e69834
- Horst, G.P., Sarnelle, O., White, J.D., Hamilton, S.K., Kaul, R.B., Bressie, J.D., 2014. Nitrogen availability increases the toxin quota of a harmful cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Water Res.* 54, 188–198.
- Hotto A., Satchwell M., Berry D., Gobler C., Boyer G. (2008). Spatial and temporal diversity of microcystins and microcystin-producing genotypes in Oneida Lake, NY. *Harmful Algae* 7, 671–681.
- Hoguanne, A. M., Green, C. L., Bowers, D. G., & Nordez, S. (2012). A note on using a digital camera to measure suspended sediment load in Maputo Bay, Mozambique. *Remote sensing letters*, 3(3), 259-266.
- Huisman J, Matthijs HCP, Visser PM. (2005). *Harmful cyanobacteria*. Dordrecht:Springer.
- Informe sobre la calidad del agua en la cuenca del Río Santa Lucía: estado de situación y recomendaciones 21/5/2013.
- IPCC (2001). A report of working group I of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Summary for Policymakers and Technical Summary.
- Jacquet, C., Thermes, V., De Luze, A., Puiseux-Dao, S., Bernard, C., Joly, J.S. et al. (2004) Effects of Microcystin-LR on Development of Medaka Fish Embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicol* 43: 141-147.
- Jochimsen, E.M., Carmichael, W.W., An, J.S., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C.E., Antunes, M.B., de Melo Filho, D.A., Lyra, T.M., Barreto, V.S., Azevedo, S.M., Jarvis, W.R. (1998) Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis centre in Brazil. *The New England Journal of Medicine* 338(16):873-878.
- Jungmann, D., Ludwischowski, K.U., Faltin, V., Benndorf, J. (1996). Field study to investigate environmental factors that could effect microcystin synthesis of a *Microcystis* population in the Bautzen reservoir. *Hydrobiol.* 81 (4), 493e501.
- Kardinaal, W. E. A., Janse, I., Kamst-van Agterveld, M., Meima, M., Snoek, J., Mur, L. R., ... & Visser, P. M. (2007a). *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes. *Aquatic Microbial Ecology*, 48(1), 1-12.
- Kardinaal, W. E. A., Tonk, L., Janse, I., Hol, S., Slot, P., Huisman, J., & Visser, P. M. (2007b). Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Applied and environmental microbiology*, 73(9), 2939-2946.
- Kardinaal, W. E. A., & Visser, P. M. (2005). Dynamics of cyanobacterial toxins. *Harmful Cyanobacteria Aquatic Ecology Series, Springer, Dordrecht, the Netherlands*, 41-64.
- Kassambara, A., & Mundt, F. (2016). Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. *R package version*, 1(3).
- Kim, S.-G., Joung, S.-H., Ahn, C.-Y., Ko, S.-R., Boo, S.M., Oh, H.-M. (2010). Annual variation of *Microcystis* genotypes and their potential toxicity in water and sediment from a eutrophic reservoir: population diversity of *Microcystis spp.* during algal bloom. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 93–102.
- Kirk, J. T. (1994). *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge university press.
- Kleinkauf, H., and von Döhren, H. (1996). A non-ribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 236:335–351.
- Komárek, J., Komárková, J. (2002). Review of the European *Microcystis*-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycol. Olomouc* 2, 1–24.
- Kruk, C., Segura, A. M., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D., de la Escalera, G. M., ... & Piccini, C. (2017). A multilevel trait-based approach to the ecological performance of *Microcystis aeruginosa* complex from headwaters to the ocean. *Harmful algae*, 70, 23-36.
- Kruk C., Suárez C., Ríos M., Zaldúa N., M. D. (2013). Análisis Calidad de Agua en Uruguay, 9. Vida Silvestre.
- Kruk, C & Segura, AM. (2012). The habitat template of phytoplankton morphology-based functional groups. *Hydrobiologia*, Edición especial. Phytoplankton responses to human impacts at different scales. Pp 1-12.
- Kruk C, Ethm P, Van Nes eh, Huszar VLM, Costa LS, Scheffer M. (2011) Phytoplankton community composition can be predicted best in terms of morphological groups. *En: Limnology & Oceanography*,56: 110-118.
- Kruk C., Huszar V., Peeters E., Bonilla S., Costa L., Lurling M., Reynolds C., Scheffer M. (2010). A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology*, 55(3), 614–627.
- Kruk Gencarelli, C. C., Silveira, L., Beyhaut, G. M., Scaffo, N. M., Paggi, M., Sives, J. C. Q., ... & Alberto, F. (2006). *Biodiversidad y calidad de agua de 18 pequeñas lagunas en la costa sureste de Uruguay* (No. 504.4 (899) BAS).
- Kruk, C., & De León, L. (2002). Asociaciones de fitoplancton en lagos y embalses del Uruguay: validación y aplicación a la gestión de sistemas acuáticos. *El agua en Iberoamérica: de la limnología a la gestión en Sudamérica. A. Fernández-Cirelli and G. Chalar (Eds.) CYTED XVII y CETA*, 143-155.
- Kurmayer R., Christiansen G., and Chorus I. (2003). The Abundance of Microcystin-Producing Genotypes Correlates Positively with Colony Size in *Microcystis sp.* and Determines Its Microcystin Net Production in Lake Wannsee. *Applied and environmental microbiology*, p. 787–795.

- Kutser, T., Metsamaa, L., Strömbeck, N., & Vahtmäe, E. (2006). Monitoring cyanobacterial blooms by satellite remote sensing. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67(1), 303-312.
- Leeuw, T. (2014). *Crowdsourcing Water Quality Data Using the iPhone Camera*. M.Sc. thesis, University of Maine, US.
- Leppänen J.-M., Rantajarvi E., Hällfors S., Kruskopf K., Laine V. (1995). Unattended monitoring of potentially toxic phytoplankton species in the Baltic Sea in 1993, *J. Plankton Res.*, 17, 891 – 902.
- Liaw, A., Wiener, M., 2002. Classification and regression by randomForest. *R News* 2, 18–22.
- Lukac, M., and Aegerter, R. (1993). Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 31:293–305.
- Martínez de la Escalera, G. M., Kruk, C., Segura, A. M., Nogueira, L., Alcántara, I., & Piccini, C. (2017). Dynamics of toxic genotypes of *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) through a wide freshwater to marine environmental gradient. *Harmful algae*, 62, 73-83.
- Martínez de la Escalera, G., Antoniadis, D., Bonilla, S., Piccini, C. (2014). Application of ancient DNA to the reconstruction of past microbial assemblages and for the detection of toxic cyanobacteria in subtropical freshwater ecosystems. *Mol. Ecol.* 23, 5791–5802.
- Matthews, M. W., & Bernard, S. (2013). Using a two-layered sphere model to investigate the impact of gas vacuoles on the inherent optical properties of *Microcystis aeruginosa*. *Biogeosciences*, 10, 8139–8157.
- Mazzeo, N., Clemente, J., García-Rodríguez, F., Gorga, J., Kruk, C., Larrea, D., ... & Scasso, F. (2002). Eutrofización: causas, consecuencias y manejo. Perfil Ambiental del Uruguay. Montevideo: Nordan-Comunidad, 39-56.
- Meissner, S., Steinhäuser, D., Dittmann, E. (2015). Metabolomic analysis indicates a pivotal role of the hepatotoxin microcystin in high light adaptation of *Microcystis*. *Environ. Microbiol.* 17 (5), 1497–1509.
- Metsamaa L., Kutser T., Strömbeck N. (2006). Recognising cyanobacterial blooms based on their optical signature: a modelling study, *Boreal Env. Res.*, 11, 493-506.
- Mobley, C. D. (1999). Estimation of the remote-sensing reflectance from above-surface measurements. *Applied Optics*, 38(36), 7442–7455.
- Montecino V., Paredes M., Vargas C., Uribe P., Giglio S., Pizarro G. (2008). Bio-óptica y estructura de tamaños del fitoplancton asociadas con producción biológica en la región de Aysén. *Ciencia y Tecnología del Mar*, Vol. 31, Núm. 1, pp. 83-9
- Montes-Hugo, M., Mohammadpour, G. (2013). Satellite-derived suspended particulates in the Saint Lawrence Estuary: Uncertainties due to bottom effects. *Can. J. Rem. Sens.*, 34, 444-454.
- Morel A, Maritorena S. (2001). Bio-optical properties of oceanic waters: a reappraisal. *J. Geophys. Res.* 106: 7163–7180
- Oberemm, A., Fastner, J., and Steinberg, C.E.W. (1997) Effects of Microcystin-LR and Cyanobacterial Crude Extracts on Embryo-Larval Development of Zebrafish (*Danio rerio*). *Water Research* 31: 2918-2921.
- O’Farrell, I., & Izaguirre, I. (2014). Phytoplankton of the middle and lower stretches of the Uruguay River. *Advances in Limnology*, 65, 113-126.
- O’Farrell, I., Bordet, F., & Chaparro, G. (2012). Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: validation of dominant eco-strategies. *Hydrobiologia*, 698(1), 175-190.
- Oliver, R. L., & Ganf, G. G. (2000). Freshwater blooms. In *The ecology of cyanobacteria* (pp. 149-194). Springer Netherlands.
- Oliver, R. L., & Ganf, G. G. (1988). The optical properties of a turbid reservoir and its phytoplankton in relation to photosynthesis and growth (Mount Bold Reservoir, South Australia). *Journal of Plankton Research*, 10(6), 1155-1177.
- Olmanson LG., Bauer ME., Brezonik PL. (2008). A 20-year Landsat water clarity census of Minnesota’s 10,000 lakes. *Remote Sense Environ* 112:4086–4097, doi:10.1016/j.rse.2007.12.013.
- OSE (2009). Informe del comportamiento de las cianobacterias en el agua bruta de Fray Bentos. Montevideo: Obras Sanitarias del Estado.
- Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S., Watanabe, M.M. (2001). A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the rules of the bacteriological code. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 873–879.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., & Matsumoto, S. (1999). Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research*, 47(3), 189-197.
- Paerl, H. W. (2014). Mitigating harmful cyanobacterial blooms in a human-and climatically-impacted world. *Life*, 4(4), 988-1012.
- Paerl, H.W., Paul, V.J. (2012). Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* 46 (5), 1349–1363.

- Paerl, H.W., Xu, H., McCarthy, M.J., Zhu, G., Qin, B., Li, Y., Gardner, W.S. (2011). Controlling harmful cyanobacterial blooms in a hyper-eutrophic lake (Lake Taihu China): the need for a dual nutrient (N&P) management strategy. *Water Research* 45 (5) 1973–1983.
- Paerl HW, Huisman J. (2008). Blooms Like It Hot. *En: Science*,320: 57-58.
- Paerl, H. W., Tucker, J., & Bland, P. T. (1983). Carotenoid enhancement and its role in maintaining blue-green algal (*Microcystis aeruginosa*) surface blooms. *Limnology and oceanography*, 28(5), 847-857.
- Pearson, L. A., Hisbergues, M., Börner, T., Dittmann, E., & Neilan, B. A. (2004). Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Applied and environmental microbiology*, 70(11), 6370-6378.
- Penn, K., Wang, J., Fernando, S.C., Thompson, J.R. (2014). Secondary metabolite gene expression and interplay of bacterial functions in a tropical freshwater cyanobacterial bloom. *ISME J.* 8 (9), 1866–1878.
- Pereira, D. A., & Giani, A. (2014). Cell density-dependent oligopeptide production in cyanobacterial strains. *FEMS microbiology ecology*, 88(1), 175-183.
- Pérez MC, Bonilla S, De León L, Smarda J, Komárek J. (1999). A bloom of *Nodulariabaltica*-*spumigena* group (Cyanobacteria) in a shallow coastal lagoon of Uruguay, 706 South America. *En: Algological Studies*, 93: 91-101.
- Pimentel, J. S., & Giani, A. (2014). Microcystin production and regulation under nutrient stress conditions in toxic *Microcystis* strains. *Applied and environmental microbiology*, 80(18), 5836-5843.
- Quibell, G. (1992). Estimating chlorophyll concentrations using upwelling radiance from different freshwater algal genera, *International Journal of Remote Sensing*, 13:14, 2611-2621
- R Core Team (2017). R: a language and environment for statistical computing. *Vienna: R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria.*
- Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., Sivonen, K. (2004). Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2), 568–573.
- Reynolds, C. S. (2006). *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Reynolds, C.S., Jaworski G. H. M., Cmiech H. A. and Leedale G. F. (1981). On the Annual Cycle of the Blue-Green Alga *Microcystis Aeruginosa* Kütz. *Emend. Elenkin. Biological Sciences*, Vol. 293, No. 1068 (Jul. 16, 1981), pp. 419-477.
- Rodríguez-Gallego L. (2010). *Eutrofización de las lagunas costeras de Uruguay: impacto y optimización de los usos del suelo*. Tesis de Doctorado - PEDECIBA Biología. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Sacristán Romero F. (2006). La Teledetección satelital y los sistemas de protección ambiental. *AquaTIC*, nº 24.
- Salas, H., Martino, P. (1990). *Metodologías simplificadas para la evaluación de eutrofización en lagos cálidos tropicales*. Lima:CEPIS/HPE/OPS.
- Saxton, M.A., Arnold, R.J., Bourbonniere, R.A., McKay, R.M.L., Wilhelm, S.W. (2012). Plasticity of total and intracellular phosphorus quotas in *Microcystis aeruginosa* cultures and Lake Erie algal assemblages. *Front. Microbiol.* 3 (3).
- Scott, L.L., Downing, S., Phelan, R.R., Downing, T.G. (2014). Environmental modulation of microcystin and b-N-methylamino-L-alanine as a function of nitrogen availability. *Toxicon* 87, 1–5.
- Segura, A. M., Piccini, C., Nogueira, L., Alcántara, I., Calliari, D., & Kruk, C. (2017). Increased sampled volume improves *Microcystis aeruginosa* complex (MAC) colonies detection and prediction using Random Forests. *Ecological Indicators*, 79, 347-354.
- Siegel, H., Ohde, T., Gerth, M., Lavik, G., & Leipe, T. (2007). Identification of coccolithophore blooms in the SE Atlantic Ocean off Namibia by satellites and in-situ methods. *Continental shelf research*, 27(2), 258-274.
- Sipari, H., Rantala-Ylinen, A., Jokela, J., Oksanen, I., Sivonen, K. (2010). Development of a chip assay and quantitative PCR for detecting microcystin synthetase *ecyE* gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3797–3805.
- Sivonen, K., Jones, G. (1999). *Cyanobacterial toxins*. In: Chorus, I., Bartram, J. (Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, New York, pp. 41–111.
- Sivonen, K. (1990). Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and environmental microbiology*, 56(9), 2658-2666.
- Sivonen, K., Carmichael, W. W., Namikoshi, M., Rinehart, K. L., Dahlem, A. M., & Niemelä, S. I. (1990). Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. *Applied and environmental microbiology*, 56(9), 2650-2657.
- Smayda T. (1997). What is a bloom? *En: Limnology and Oceanography*,42:1132-1136.
- Soja-Woźniak, M., Craig, S., Kratzer, S., Wojtasiewicz, B., Darecki, M., Jones, C. (2017). A novel statistical approach for ocean colour estimation of inherent optical properties and cyanobacteria abundance in optically complex waters. *Remote Sens.* 9 (4), 343.
- Sosik HM, Mitchell BG. (1995). Light absorption by phytoplankton, photosynthetic pigments and detritus in the California Current System. *Deep-Sea Res.* 42: 1717–1748.
- Straub, C., Quillardet, P., Vergalli, J., de Marsac, N.T., Humbert, J.-F. (2011). A day in the life of *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. *PLoS ONE* 6 (1), e16208.

- Sunyoung K., Robson C., Zimmerman T., Pierce J., Haber E. (2011). Creek Watch: Pairing Usefulness and Usability for Successful Citizen Science. In: Proceedings of the 2011 Annual Conference on Human Factors in Computing Systems (CHI '11). ACM, New York, NY, USA, pp 2125–2134.
- Svensen, Ø., Frette, Ø., & Erga, S. R. (2007). Scattering properties of microalgae: the effect of cell size and cell wall. *Applied optics*, 46(23), 5762-5769.
- Strömbeck, N. (2001). Water Quality and Optical Properties of Swedish Lakes and Coastal Waters in Relation to Remote Sensing. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology.
- Tanabe, Y., Sano, T., Kasai, F., & Watanabe, M. M. (2009). Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (mcy) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC evolutionary biology*, 9(1), 115.
- Teixeira, M. da G, Costa, M. da C, De Carvalho, V. L, Pereira, M. dos S, and Hage, E. (1993) Gastroenteritis Epidemic in the Area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 27: 244-53.
- Tillett D, Dittmann E, Erhard M, von Döhren H, Börner T, Neilan BA. (2000). Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide polyketide synthetase system. *Chem Biol.* (10):753-64.
- Tisdale, E.S. (1931) The 1930-1931 Drought and Its Effect Upon Public Water Supply. *American Journal of Public Health and the Nations Health* 21: 1203-1215.
- Toivanen T., Koponen S., Kotovirta V., Molinier M., Chengyuan P. (2013). Water quality analysis using an inexpensive device and a mobile phone. *Environ Syst Res* 2(9) doi:10.1186/2193-2697-2-9
- Tzortziou, M., Subramaniam, A., Herman, J. R., Gallegos, C. L., Neale, P. J., & Harding, L. W. (2007). Remote sensing reflectance and inherent optical properties in the mid Chesapeake Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 72(1), 16-32.
- Vaillancourt, R.D., Brown, C.W., Guillard, R.R.L., Balch, W.M. (2004). Light backscattering properties of marine phytoplankton: relationships to cell size, chemical composition and taxonomy. *J. Plankton Res.* 26 (2), 191-212.
- Van de Waal, D.B., Verspagen, J.M.H., Lu"rling, M., Van Donk, E., Visser, P.M., Huis-man, J. (2009). The ecological stoichiometry of toxins produced by harmful cyanobacteria: an experimental test of the carbon-nutrient balance hypothesis. *Ecol. Lett.* 12 (12), 1326–1335.
- Van der Westhuizen, A., Eloff, J., Kruger, G. (1986). Effect of temperature and light (fluence rate) on the composition of the toxin of the cyanobacterium *Micro-cystis aeruginosa* (UV-006). *Arch. Hydrobiol.* 108 (2), 145–154.
- Vidal, F., Sedan, D., D'Agostino, D., Cavalieri, M. L., Mullen, E., Parot Varela, M. M., Flores C., Josep Caixach J. & Andrinolo, D. (2017). Recreational Exposure during Algal Bloom in Carrasco Beach, Uruguay: A Liver Failure Case Report. *Toxins*, 9(9), 267.
- Vidal, L., & Britos, A. (2012). Uruguay: Occurrence, toxicity and regulation of Cyanobacteria. *Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries*, 130.
- Vidal L and Kruk C. (2008). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. En: *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 3: 142-151.
- Vidal, L. (2002). *Variación temporal de la morfología de Microcystis aeruginosa kützing en el embalse de salto grande*, 1–39. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 2010.
- Yang, Z., Kong, F., Shi, X., Cao, H. (2006). Morphological response of *Microcystis aeruginosa* to grazing by different sorts of zooplankton. *Hydrobiologia* 563 (1), 225–230.
- Wang X, Sun M, Xie M, Liu M, Luo L, Li P, Kong F. (2013). Differences in microcystin production and genotype composition among *Microcystis* colonies of different sizes in Lake Taihu. *Water Res.* 1;47(15):5659-69
- Watanabe, M. F., Harada, K., Carmichael, W. W., & Fujiki, H. (1995). *Toxic Microcystis* (Vol. 21). CRC Press.
- Watanabe, M.F., Oishi, S. (1985). Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Envi-ron. Microbiol.* 49 (5), 1342–1344.
- Welker, M., Šejnohová, L., Némethová, D., Döhren, H., Jarkovský, J., & Maršálek, B. (2007). Seasonal shifts in chemotype composition of *Microcystis* sp. communities in the pelagial and the sediment of a shallow reservoir. *Limnology and Oceanography*, 52(2), 609-619.
- Welker, M., Von Döhren, H., Täuscher, H., Steinberg, C. E., & Erhard, M. (2003). Toxic *Microcystis* in shallow lake Müggelsee (Germany)—dynamics, distribution, diversity. *Archiv für Hydrobiologie*, 157(2), 227-248.
- Wetzel, R.G. (1983). *Limnology*, 2nd Ed. Saunders Coll.
- White, M., Fieghery, L., Bowers, D., O'riain, G. and Bower, P. (2005). Using a digital camera for river plume and water quality measurements. *International Journal of Remote Sensing*, 26, pp. 4405–4419.
- Whitmire, A. L., Pegau, W. S., Karp-Boss, L., Boss, E., & Cowles, T. J. (2010). Spectral backscattering properties of marine phytoplankton cultures. *Optics Express*, 18(14), 15073-15093.

- WHO, (2003). Cyanobacterial toxins: microcystin-LR in drinking water. In: *Organization W.H. (Eds.)*, Background Document for Preparation of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization, Geneva.
- Wojtasiewicz, B., and Stoń-Egiert, J. (2016). Bio-optical characterization of selected cyanobacteria strains present in marine and freshwater ecosystems. *Journal of applied phycology*, 28(4), 2299-2314.
- Wojtasiewicz, B., & Stramski, D. (2010). Chlorophyll-specific absorption and scattering coefficients of selected cyanobacteria. *Anchorage, Alaska*.
- World Health Organization (2004). Guidelines for Drinking-Water Quality, Vol. 1. WHO Publishing, Geneva (Recommendations).
- Wormer, L. (2009). *Distribución y degradación de las cianotoxinas microcistina y cilindrospermopsina en embalses*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Woźniak, M., Bradtke, K.M., Darecki, M., Krężel, A. (2016). Empirical model for phycocyanin concentration estimation as an indicator of cyanobacterial bloom in the optically complex coastal waters of the Baltic Sea. *Remote Sens.* 8 (3).
- Woźniak B, Dera J. (2007) *Light absorption in sea water*. Springer, New York
- Zhou, J., Bruns, M.A. y Tiedje, J.M. (1996). En: *American Society for Microbiology DNA Recovery from Soils of Diverse Composition*, 62(2), pp.316-322.
- Zhu, W., Zhou, X., Chen, H., Gao, L., Xiao, M., Li, M. (2016). High nutrient concentration and temperature alleviated formation of large colonies of Microcystis: evidence from field investigations and laboratory experiments. *Water Res.* 101, 167–175.
- Zilberg, B. (1966) Gastroenteritis in Salisbury. European Children-a Five-Year Study. *Central African Journal of Medicine* 12: 164-8.
- Zurawell, R.W., Chen, H., Burke, J.M., Prepas, E.E. (2005). Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *J. Toxicol. Environ. Health B* 8 (1), 1–37.

Anexo I. Material adicional

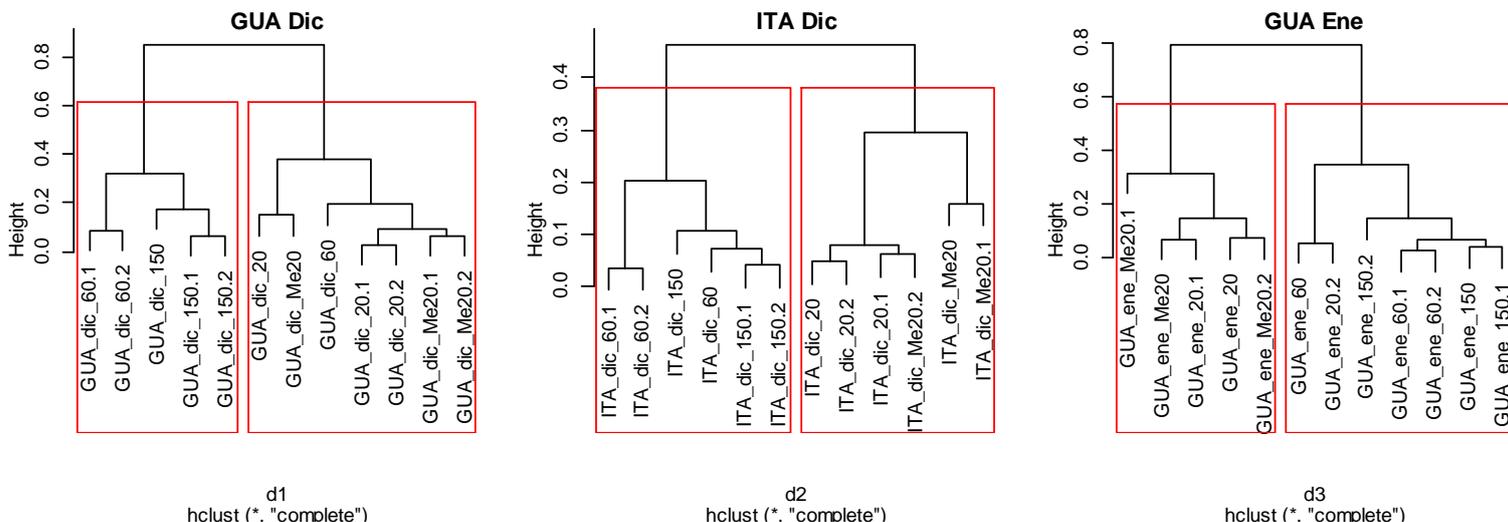


Fig. 72. Comunidades de genotipos *mcyl* en GUA e ITA durante diciembre y enero. Con los cuadrados rojos se separan las dos ramas principales del análisis. Los cluster se calcularon mediante la función `hclust` por el método euclidiano. Las matrices se traspusieron, centraron y escalaron.

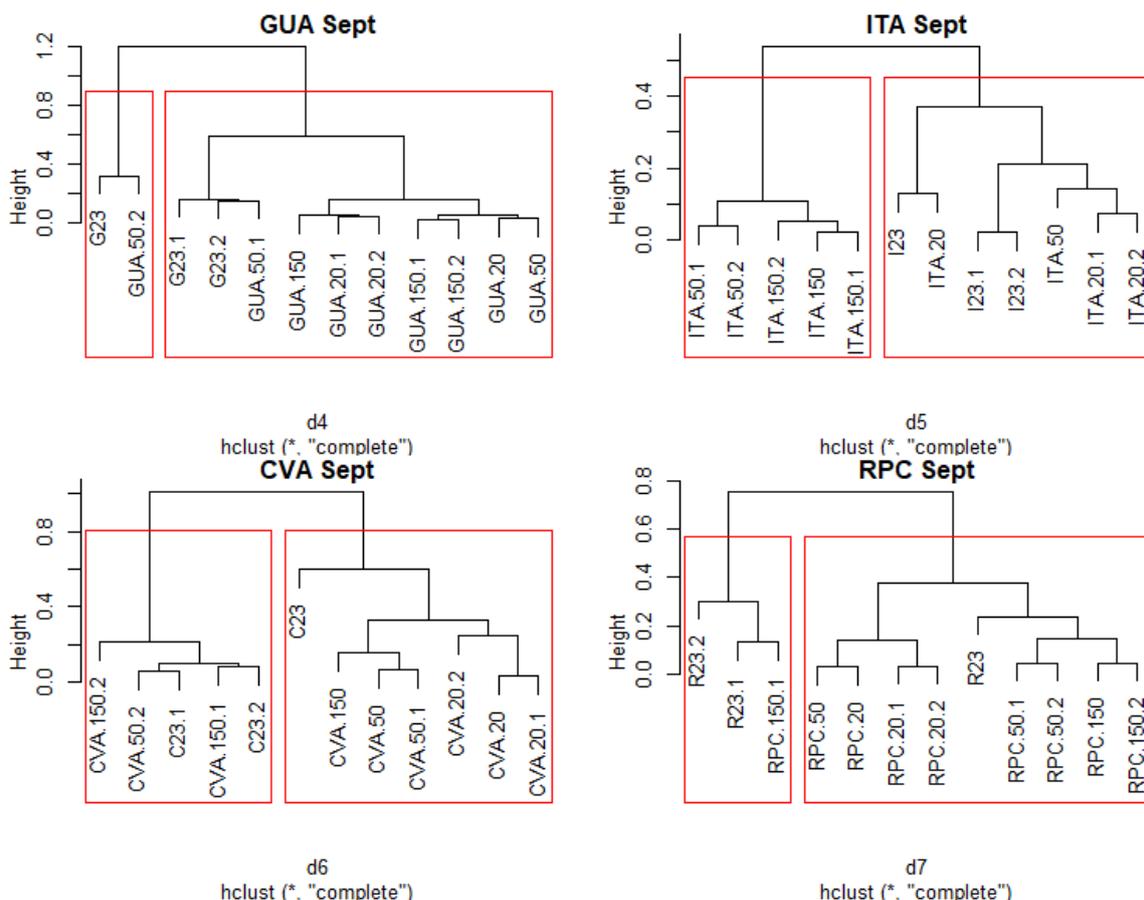


Fig. 73. GUA, ITA, CVA y RPC en septiembre 2015 analizados por separado. Con los cuadrados rojos se separan las dos ramas principales del análisis. Los cluster se calcularon mediante la función `hclust` por el método euclidiano. Las matrices se traspusieron, centraron y escalaron.

A modo de testeo se creó una base de datos de fotos tomadas en diferentes playas y en diferentes días, los resultados del R_{rs} de la razón rojo/verde mostraron que los valores por triplicado en cada sitio se mantuvieron constantes y la variabilidad dentro de cada sitio fue mínima. Hubo dos lugares que mostraron una alta variabilidad (representados en la gráfica con *). Uno fue el puertito buceo donde se obtuvo una gran diferencia de valores en el R_{rs} de la razón rojo/verde porque los datos corresponden a dos días diferentes; un valor se obtuvo con la foto cuando había floración de CMA y otro a cuando no había floración. El otro lugar fue el lago Jover. Esta variabilidad se debió a que un valor corresponde a una parte del lago, donde el agua estaba cristalina, y el otro valor a la orilla del lago, donde el agua se encontraba roja y con bastantes desperdicios. Los sitios donde el agua se encontró más cristalina mostraron un valor de las razones de 1 debido a que los valores en cada banda fueron iguales (línea punteada). Los eventos de floración estuvieron por debajo del valor 1,216 (Fig. 78).

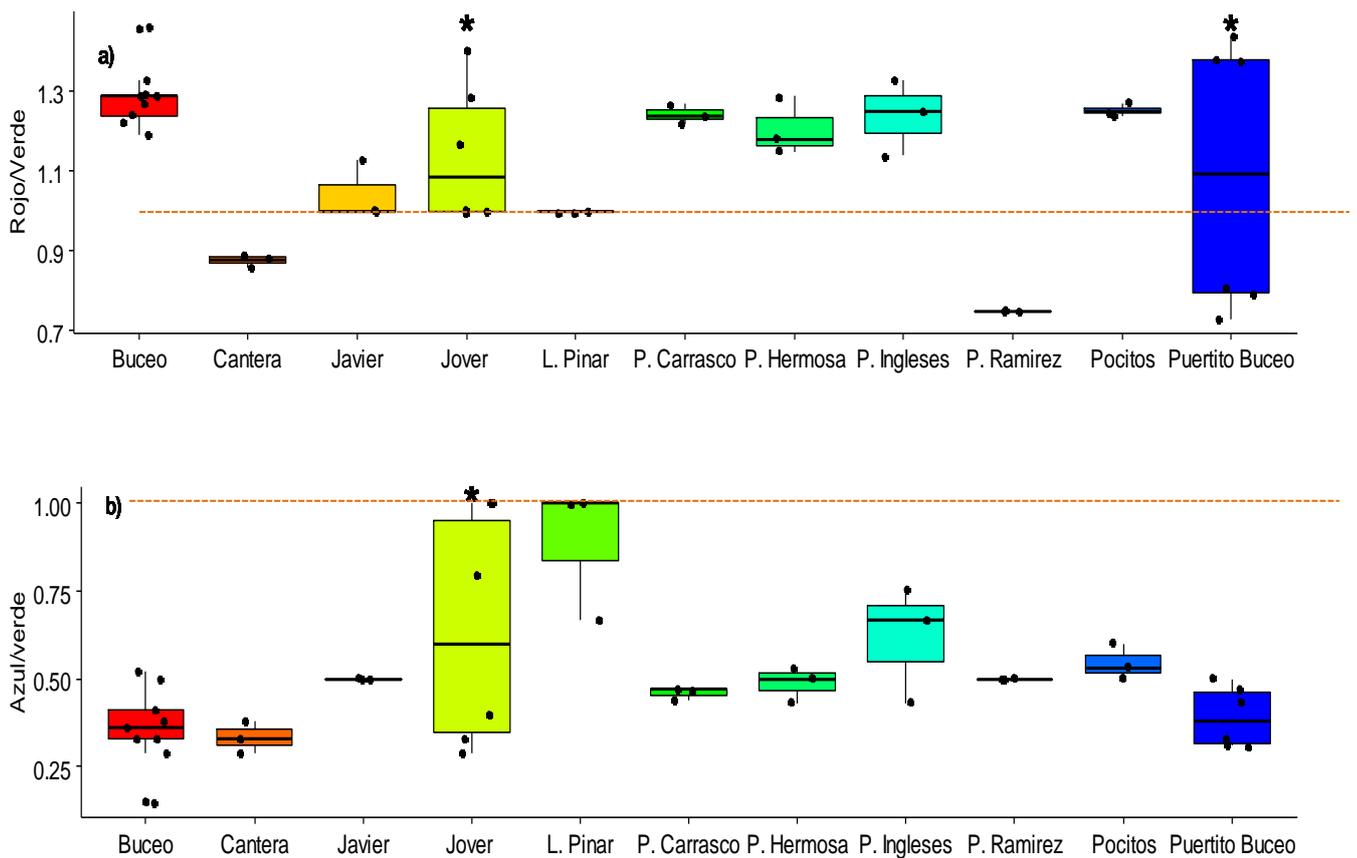


Fig. 78. Se muestra la variabilidad de la razón rojo/verde (a) y azul/verde (b) en de los sistemas acuáticos muestreados. Los sitios con * fueron donde se encontró la mayor variabilidad de los datos. La raya punteada establece el valor de 1 que se consideraría el agua transparente que alcanzaron las curvas de calibración (Fig. 75-76).



HydroColor: A Water Quality App



- 1) Abrir la aplicación con el GPS encendido y esperar a que la aplicación nos geo localice.
- 2) Proceder a realizar la foto de la carta de grises. Inclinar el móvil hasta hacer coincidir las flechas verdes con la raya verde y mover la cámara hasta hacer coincidir el norte (N) con alguna de las dos flechas verdes. Una vez que la brújula y el inclinómetro estén bien posicionados se pondrá en verde la palabra capture y el recuadro de la foto. Ese será el momento de realizar la foto.
- 3) Realizar el mismo procedimiento con la foto del cielo y del agua.
- 4) Pulsar Analyze Images y guardar los datos con el nombre que se le quiera otorgar
- 5) Repetir el procedimiento para sacar un mínimo de 3 set de fotos por sitio muestreado.

Anexo II: Actividades realizadas durante el doctorado (Abril 2015-Abril 2018)

Difusión de resultados

Póster: Proyecto para la caracterización morfológica, genética y óptica de floraciones tóxicas y no tóxicas del Complejo *Microcystis aeruginosa*. Susana Deus Álvarez, Claudia Piccini, Carla Kruk y Martín Montes. Primeras jornadas sobre eutrofización y floraciones algales nocivas en el río Uruguay. CARU (Colón, Agosto 2015).

Presentación oral: Caracterización morfológica, genética y óptica de floraciones tóxicas y no tóxicas del Complejo *Microcystis aeruginosa*. Susana Deus Álvarez, Claudia Piccini, Carla Kruk y Martín Montes. III Jornadas de Estadística Aplicada – (La Paloma, noviembre 2015).

Presentación oral: Cianobacterias, ¿Qué son, como se detectan y cómo se distribuyen? Susana Deus Álvarez y Gabriela Martínez de la Escalera. Jornadas sobre agua organizadas por la CTM y celebradas en (Bella Unión, noviembre del 2015).

Póster: Proyecto para la caracterización morfológica, genética y óptica de floraciones tóxicas y no tóxicas del Complejo *Microcystis aeruginosa*. Susana Deus Álvarez, Claudia Piccini, Carla Kruk y Martín Montes. Encuentro de Jóvenes Microbiólogos del IIBCE (Montevideo, junio 2016).

Presentación oral: *Microcystis* spp. HABs Identification system based on mobile Networked technologies. Susana Deus Álvarez, Claudia Piccini, Carla Kruk y Martín Montes. Water microbiology and novel technologies conferences (Chicago, julio 2016).

Póster: Detección de floraciones algales mediante herramientas de sensoramiento remoto. Susana Deus Álvarez, Claudia Piccini, Carla Kruk y Martín Montes. JIBE (CURE-Rocha, diciembre 2016).

Póster: ¿El tamaño importa? Susana Deus Álvarez, Carla Kruk, Gabriela Martínez de la Escalera, Claudia Piccini. XII Encuentro Nacional de Microbiólogos y II Encuentro de Virólogos dentro del marco del Primer Congreso Nacional de Bociencias (Montevideo, Mayo 2017).

Presentación Oral: Detección de floraciones algales mediante herramientas *remote sensing*. Susana Deus Álvarez, Claudia Piccini, Carla Kruk y Martín Montes. CSIC (Barcelona, España; septiembre 2017).

Póster: Detección de floraciones algales mediante herramientas *remote sensing*. Susana Deus Álvarez, Claudia Piccini, Carla Kruk. IV Jornadas de estadística (La Paloma, octubre 2017).

Presentación oral: Cianobacterias y su amenaza a la calidad del agua. Susana Deus Álvarez y Gabriela Martínez de la Escalera. Divulgadoras científicas en las semanas de la ciencia de los años 2014, 2015, 2016 y 2017.

Cursos y talleres

- Enero – Febrero 2015: Regional Training: Phytoplankton bio-optical variability: application to the study of coastal systems (Ensenada México).
- Abril – Julio 2015: Curso de la CAP en asesoría para la redacción de la tesis (Montevideo).
- Septiembre de 2015: Segunda Reunión Nacional de Usuarios de Espectroradiómetros. Primera Jornada Nacional de Intercalibración de Instrumentos. II Foro de discusión sobre <<Protocolos y Metadatos de la Información Radiométrica>>. Instituto de Clima y Agua del INTA (Castelar-Buenos Aires).
- Junio 2015: Taller introductorio de R para el análisis de datos en ciencias ambientales (Montevideo).
- Marzo – Junio 2016: Curso Estadística Avanzada y Aplicaciones (CURE-Rocha).
- Julio – Septiembre 2016: Pasantía de doctorado (Rimouski – Canadá).
- Octubre 2016: Hyperspectral Remoto Sensing (San Martín - Buenos Aires).
- Noviembre 2017: Curso de posgrado PEDECIBA biología y geociencias. microorganismos como centinelas del cambio global (Rocha – Uruguay).

