

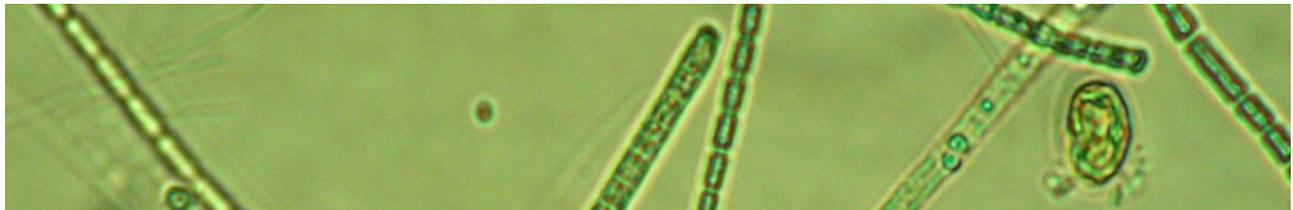


Facultad de Ciencias  
*Universidad de la República*



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**TESINA**  
**LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Aproximación experimental a la sucesión de grupos morfo-funcionales fitoplanctónicos y al efecto de una cianobacteria invasora**



**FLORENCIA SARTHOU**

**Docente Orientador: Dra. Carla Kruk**

**Sección Limnología, Instituto de  
Ecología y Ciencias Ambientales**

**Facultad de Ciencias**

**Universidad de la República**

Tribunal: Dra. Sylvia Bonilla, Dr. Danilo Calliari y Dra. Carla Kruk

Marzo de 2011

## INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Objetivo general .....	10
Objetivos específicos .....	10
MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
Área de estudio y construcción de los inóculos.....	11
Diseño experimental.....	12
Seguimiento de los experimentos .....	14
<i>Toma de muestras</i> .....	14
<i>Cambio global de la comunidad</i> .....	14
<i>Evolución de la estructura comunitaria</i> .....	14
Análisis de datos .....	16
RESULTADOS .....	19
Primer experimento piloto.....	19
<i>Cambio comunitario global</i> .....	19
<i>Evolución de la estructura comunitaria</i> .....	21
Experimento final.....	21
<i>Cambio comunitario global</i> .....	21
<i>Evolución de la estructura comunitaria</i> .....	24
<i>Desarrollo de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i></i> .....	27
DISCUSIÓN.....	28
Sucesión de GFBM y variación de rasgos morfológicos .....	28
Invasión con <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> .....	31
Perspectivas.....	34
CONCLUSIONES.....	36
AGRADECIMIENTOS .....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38

## RESUMEN

El fitoplancton brinda numerosos servicios ecológicos, como la producción primaria y el secuestro de gases de efecto invernadero. Por otra parte, el crecimiento en exceso de ciertas especies, principalmente cianobacterias productoras de toxinas, resulta un riesgo para los ecosistemas acuáticos y el hombre. Entre estas especies se encuentra *Cylindrospermopsis raciborskii*, de origen tropical y potencial productora de toxinas, la cual se encuentra en expansión hacia zonas templadas y subtropicales. Por estas razones es necesario predecir la respuesta del fitoplancton a los cambios ambientales. Sin embargo, la predicción a nivel de especies resulta casi imposible, no ocurriendo lo mismo cuando estas son agrupadas. Para tal fin, el modelo de grupos funcionales basados en morfología (GFBM), que agrupa a los organismos en base a rasgos morfológicos (ej. volumen, V; dimensión máxima lineal, MLD; superficie-volumen, S/V), que reflejan sus desempeño en el ambiente, resulta una herramienta útil. Para generar un método predictivo, este modelo debe ser validado experimentalmente, iniciándose dicha validación en el estudio de una sucesión autogénica. En el presente trabajo se llevaron a cabo experimentos comunitarios bajo condiciones de temperatura y carga de nutrientes similares a las de un lago eutrófico durante el verano. En todos los casos se realizó un seguimiento de la biomasa, de los rasgos morfológicos y del reemplazo de GFBM en la sucesión. Se hicieron dos tratamientos uno únicamente con inóculo al inicio y otro con inóculo inicial e invasión de *Cylindrospermopsis raciborskii* en un estadio intermedio de la sucesión. En este último se evaluaron los efectos en la comunidad y en la especie invasora. En todos los casos, el transcurso de la sucesión resultó en la dominancia de organismos pertenecientes al GFBM III (filamentos con alto MLD y alta S/V) que se ven favorecidos cuando la intensidad de luz es baja. Este GFBM incluye numerosas especies potenciales productoras de toxinas, lo cual tiene implicancias para el uso de los sistemas. Por otro lado, los resultados coinciden con lo observado en la naturaleza y en modelos sobre la sucesión de GFBM en sistemas eutróficos someros, así como con la teoría del tercer estado estable formulada para éstos. En cuanto a *C. raciborskii*, se observó su persistencia en la comunidad pero no su dominio. Sin embargo se constataron efectos negativos sobre el crecimiento global, posiblemente gracias a la producción de aleloquímicos. La ausencia de dominancia podría ser explicada en base a diferencias de nicho y adecuación biológica entre *C. raciborskii* y la comunidad, o a través de la teoría de neutralidad emergente. Finalmente, para continuar el camino hacia la validación del modelo de GFBM y la evaluación de *C. raciborskii* con esta metodología, se sugiere la introducción de nuevas condiciones de temperatura y carga de nutrientes, así como de nuevas variables ambientales, tales como la herbivoría.

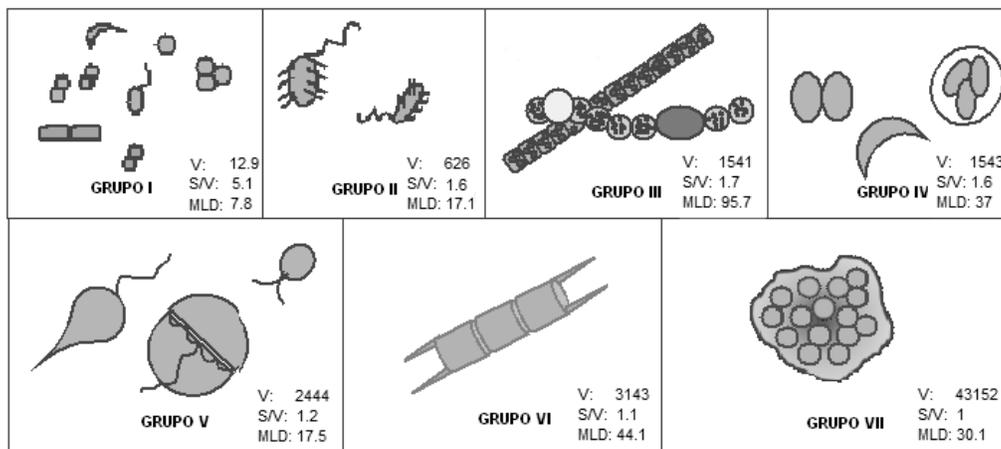
## INTRODUCCIÓN

El fitoplancton es un ensamblaje de organismos (microalgas y cianobacterias) que viven suspendidos en la columna de agua (Reynolds, 1984). Está compuesto por organismos autótrofos que ocupan un amplio rango de tamaños y formas (Finkel *et al.*, 2009). Además son responsables de aproximadamente la mitad de la producción primaria global marina (Arrigo, 2005), siendo fundamentales para el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos globales (ej. oxígeno, dióxido de carbono, Litchman & Klausmeier, 2008).

A pesar de los beneficios que provee el fitoplancton, el crecimiento excesivo de algunas especies, principalmente cianobacterias tóxicas en los sistemas límnicos, tiene consecuencias negativas para el hombre (Chorus & Bartram, 1999) y los ecosistemas (Scheffer, 1998). Asimismo, y recientemente, han aparecido ejemplos de especies de este grupo con comportamiento invasor, que se dispersan y desarrollan en nuevos sitios impactando a las comunidades o ecosistemas locales (Litchman, 2010), como es el caso de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju, una cianobacteria inicialmente considerada tropical, que cuenta con registros cada vez mayores en zonas subtropicales y templadas (Padisák, 1997; Wood & Stirling, 2003; Hamilton *et al.*, 2005; Vidal & Kruk, 2008; García *et al.*, 2009). Por lo tanto, es necesario contar con un método que permita predecir su aparición y desarrollo bajo determinadas condiciones ambientales (Kruk *et al.*, 2010). Para lograr dicha meta es necesario evaluar la variabilidad temporal de las comunidades fitoplanctónicas. Los factores que afectan dicha variabilidad involucran aspectos externos (ej. temperatura, hidrodinámica, nutrientes, luz, depredadores, entre otros) (Reynolds, 1984) y aspectos autogenerados por la comunidad (ej. competencia, facilitación) (Roy & Chattopadhyay, 2007).

Aun conociendo los factores condicionantes, sus efectos sinérgicos, así como aspectos poblacionales y comunitarios, no es posible predecir a nivel de especies el desarrollo de una comunidad de fitoplancton en un ambiente determinado (Benincà *et al.*, 2008). Sin embargo, la predicción a nivel de grupos de especies es más factible (Kruk *et al.*, 2002; Kruk *et al.*, 2010; Kruk *et al.*, 2011). Para esto se puede emplear, por ejemplo, el sistema de clasificación

taxonómica (ej. Watson *et al.*, 1997), pero este ha demostrado ser poco efectivo (Kruk *et al.*, 2011). El fitoplancton también puede ser agrupado según su función ecológica o en base a rasgos funcionales (ej. morfológicos, entre otros, Reynolds *et al.*, 2002; Violle *et al.*, 2007; Litchman & Klausmeier, 2008). Kruk *et al.* (2010) han propuesto la clasificación del fitoplancton en base a grupos funcionales basados en morfología (GFBM), los cuales reflejan la fisiología y la adecuación de los organismos al ambiente, como una aproximación para la agrupación de los organismos de acuerdo a sus rasgos morfológicos individuales, tales como la dimensión máxima lineal (MLD, por su



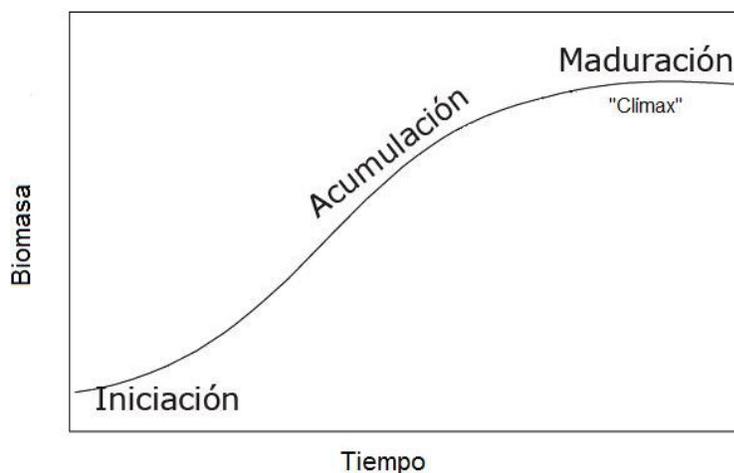
**Figura 1.** Representación esquemática de algunos de los organismos pertenecientes a cada Grupo Funcional Basado en la Morfología (GFBM). Se muestran los valores promedio de Volumen ( $V$ ,  $\mu\text{m}^3$ ), superficie-volumen ( $S/V$ ,  $\mu\text{m}^{-1}$ ) y dimensión máxima lineal (MLD,  $\mu\text{m}$ ) para cada uno de ellos. Modificado de Kruk *et al.* (2010).

sigla en inglés), la relación superficie-volumen ( $S/V$ ), presencia de aerótopos, entre otros. Dichos rasgos pueden ser medidos empleando métodos más sencillos que aquellos necesarios en otras clasificaciones. Por ejemplo, los experimentos necesarios para estimar la tasa de crecimiento de un organismo o incluso el análisis molecular preciso para reconocer la identidad de una especie. En el marco de los GFBM, no es necesario conocer exactamente la afiliación taxonómica de los mismos (Kruk *et al.*, 2010). Esto es una gran ventaja para el reconocimiento de grupos fitoplanctónicos por parte de técnicos no expertos en taxonomía, como pueden ser los encargados del monitoreo de los cuerpos acuáticos.

En base al modelo de los GFBM, el fitoplancton es clasificado en siete grupos (Figura 1). Los GFBM I (ej. *Synechococcus* sp., *Chlorella minutissima*) y II (Chrysophyceae, ej. *Mallomonas pulcherrima*) se caracterizan por el pequeño tamaño y la alta relación superficie-volumen de los organismos que lo componen, siendo la presencia de estructuras silíceas y flagelo rasgos característicos de este último. Los GFBM IV y V están conformados por organismos de tamaño intermedio a grande, sin presencia de rasgos particulares en el primero mientras que el último agrupa a organismos flagelados unicelulares. El GFBM VI incluye organismos que se caracterizan por la presencia de estructuras silíceas y la ausencia de flagelo (Diatomeas). Este grupo abarca un amplio rango de tamaños y estrategias de vida (ej. *Cyclotella atomus*, una diatomea pequeña, y *Aulacoseira granulata*, una diatomea grande). Por último, los GFBM III y VII están compuestos por los organismos de mayor tamaño (ej. *Cylindrospermopsis raciborskii* y *Microcystis aeruginosa*, respectivamente). El primero corresponde a grandes filamentos de alta relación superficie-volumen, y el segundo está compuesto por grandes colonias de baja relación superficie-volumen, rodeadas de mucílago (Kruk *et al.*, 2010). Si bien todos los GFBM son relevantes para evaluar las variaciones comunitarias y sus funciones asociadas, algunos son relativamente más trascendentes ya que incluyen especies potencialmente nocivas (en agua dulce, GFBM III y VII, Kruk *et al.*, 2010).

Para utilizar a los GFBM como un método predictivo validado es necesario analizar si su sucesión temporal coincide con lo esperado de acuerdo con las características morfológicas de los organismos. Esto es conocido principalmente para sistemas templados eutróficos (Modelo Grupo en Ecología de Fitoplancton, Sommer *et al.*, 1986, Lampert & Sommer, 2007) y experimentos con comunidades naturales (ej. Sommer, 1991). En este marco, la sucesión autogénica se produce en ausencia de la variación de factores externos a la comunidad (Figura 2), siendo esta última la única capaz de generar cambios en su ambiente (Reynolds, 1984). Al inicio de la misma se produce el crecimiento de organismos pioneros (Reynolds, 1997), de pequeño tamaño, y por lo tanto con alta relación superficie-volumen. Dichos organismos tienen una alta tasa de crecimiento y se los puede clasificar como estrategias *r*

(Margalef, 1978). Los mismos modifican las condiciones ambientales haciendo posible la persistencia de otros grupos. A medida que avanza la sucesión, además del aumento de biomasa, se puede observar la coexistencia de organismos con diversos rasgos. Luego, la sucesión alcanza un estado maduro, de equilibrio o “clímax” (Reynolds, 1997), donde se estabiliza el aumento de la biomasa. En esta etapa dominan organismos de gran tamaño, los cuales pueden tener forma filamentosa o colonial y están caracterizados por bajas tasas de crecimiento. Se trata de organismos que resultan mejores competidores cuando los recursos se ven disminuidos, dichos organismos, se pueden definir como estrategias *K* (Margalef, 1978). El transcurso de la sucesión ha sido analizado agrupando a las especies en GFBM utilizando modelos matemáticos y comparándolos con la sucesión en un lago hipereutrófico somero (Segura *et al.*, 2010a). Este trabajo es la primera aproximación experimental utilizando GFBM.



**Figura 2.** Fases de una sucesión autogénica y GFBM dominantes al inicio y al final de la misma. Modificado de (Reynolds, 1997).

*Cylindrospermopsis raciborskii* es una cianobacteria filamentosa de gran tamaño y alta relación superficie-volumen, que puede presentar heterocitos y acinetes (Graham *et al.*, 2009), por lo que se encuentra en el GFBM III. Gracias a dichos rasgos, hacia el final de una sucesión autogénica esta especie pasaría a ser una de las dominantes. Además *C. raciborskii* es una cianobacteria con comportamiento invasor, que se encuentra expandiendo su distribución desde el trópico hacia zonas más templadas. Por lo tanto presentaría características que generarían diferencias con respecto al resto de los representantes del

GFBM III, que la harían especial dentro del mismo. En la actualidad, según Briand *et al.* (2004), se han planteado tres hipótesis para explicar la tal distribución. Según la primera de ellas, diferentes ecotipos de esta especie, adaptados a bajas temperaturas habrían sido seleccionados durante su expansión hacia zonas alejadas de los trópicos. La segunda hipótesis plantea la amplia tolerancia de *C. raciborskii* a diversas condiciones ambientales, como luz y temperatura, que le permitirían persistir en zonas tanto tropicales como templadas y subtropicales. Por último, el calentamiento global y el consecuente aumento de las temperaturas de verano, favorecerían el desarrollo de esta especie de origen tropical en zonas de menor temperatura. Hasta el momento, ninguna de estas hipótesis ha logrado explicar totalmente expansión de esta cianobacteria, mientras que algunos autores sugieren la importancia de que varias de ellas, o todas ellas sean combinadas (Briand *et al.*, 2004; Haande, *et al.*, 2008). Por ejemplo, las conclusiones del trabajo realizado por Briand *et al.* (2004) sugieren que la mayor tolerancia fisiológica cambios en la intensidad de luz y temperatura conjunto con el efecto del calentamiento global, serían las principales causantes de la dispersión de *C. raciborskii*. De acuerdo a Wiedner *et al.* (2007) se trataría principalmente del cambio climático, ya que este que permitiría la dispersión esta cianobacteria tropical hacia zonas templadas y que estaría implicado en el aumento temprano de la temperatura de germinación de los acinetes luego del invierno. Además, esta especie presenta ecotipos con diferentes preferencias ambientales (Piccini *et al.*, en prensa), lo cual explicaría el éxito de esta especie en diversos sitios del planeta.

Por último, su baja palatabilidad, debido a su tamaño, y la producción de sustancias aleloquímicas, metabolitos secundarios con efecto inhibitorio sobre potenciales competidores o depredadores (Leflaive & Ten-Hage, 2007), le permitirían establecerse en nuevos ambientes (Figueredo *et al.*, 2007). A pesar de todas las características mencionadas, no ha sido dilucidado aún si esta cianobacteria es realmente diferente del resto del GFBM III y no es clara la forma en que ocurre la invasión y el lugar que ocuparía dentro de la comunidad fitoplanctónica receptora. Aún se desconoce si esta especie desplazará a los grupos predominantes o si coexistirá con los mismos en un estadio maduro de una sucesión. Es por lo tanto necesario evaluar dicho proceso teniendo en

cuenta el efecto de factores que podrían favorecer la invasión de *C. raciborskii*, como las altas temperaturas y el aumento en la carga de nutrientes de los sistemas.

Dado que la eutrofización, el proceso por el cual aumenta la carga de nutrientes en los cuerpos de agua (Kalf, 2002) es un fenómeno que afecta a la gran mayoría de los sistemas acuáticos en la actualidad y junto con la alta temperatura, son las condiciones más propicias para el desarrollo de grupos nocivos (Briand *et al.*, 2004; Paerl & Huisman, 2008) en este estudio se decidió simular las condiciones de un lago somero eutrófico, a temperaturas características de la temporada estival de zonas subtropicales. En base a la información previa y en el marco de estas condiciones ambientales nos planteamos dos hipótesis:

**1)** El reemplazo de especies de fitoplancton en una sucesión autogénica va a depender de la morfología de los propios organismos y de su pertenencia a los GFBM.

**2)** La invasión y dominio de *Cylindrospermopsis raciborskii* en una comunidad en un estadio maduro de la sucesión, van a ser posibles debido a las ventajas competitivas de esta especie sobre la comunidad invadida, las cuáles se basan en la utilización de recursos (como la luz), la alta temperatura óptima y la potencial producción de sustancias alelopáticas.

A partir de estas hipótesis se predice que:

**1)** A lo largo de la sucesión, bajo condiciones de alta temperatura y carga de nutrientes, se producirá un cambio en los rasgos morfológicos de las especies dominantes. Se pasará de la dominancia de organismos del GFBM I a una fase intermedia en la cual coexistirán varios grupos, para finalizar en un estadio en el cual la comunidad será dominada por organismos de los GFBM III y VII. A su vez, se producirá una disminución en el número de grupos taxonómicos y GFBM con respecto al inóculo.

**2)** Al introducirse *C. raciborskii* en la comunidad, ésta pasará a ser la especie dominante en la fase más madura de la sucesión.

### **Objetivo general**

Estudiar la sucesión temporal de GFBM y las consecuencias de la introducción de *C. raciborskii* en la comunidad fitoplanctónica en condiciones de alta carga de nutrientes y temperatura.

### **Objetivos específicos**

**1) a-** Analizar el cambio temporal de la biomasa de la comunidad fitoplanctónica mediante estimadores globales.

**b-** Realizar un seguimiento de los rasgos morfológicos de los organismos.

**c-** Determinar los GFBM dominantes en diferentes momentos de la sucesión.

**2)** Evaluar los cambios ocurridos luego de la introducción de *C. raciborskii*, tanto en sí misma como en la comunidad, en cuanto a biomasa, morfología y a composición.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La aproximación empleada en este trabajo fue la realización de experimentos de microcosmos utilizando fitoplancton natural de sistemas dulceacuícolas de Uruguay. En los experimentos se realizaron seguimientos temporales de inóculos de composición diversa en medio de cultivo y condiciones controladas (nutrientes, intensidad lumínica, fotoperíodo, temperatura, mezcla). Esto se llevó a cabo en tres ocasiones realizando tres experimentos, dos de ellos piloto y uno final, bajo diferentes condiciones (Tabla 1).

**Tabla 1.** Descripción general de los 3 experimentos realizados. S: Control; C: Invasión con *C. raciborskii*; Exp: experimento; F.Q.B.: Sección Físico-Química Biológica; S.L.: Sección Limnología.

Exp	Fecha	Tratamientos	Duración (días)	Nº réplicas	Concentración inicial del exp (UFR)	Agitación	Lugar
<b>Piloto 1</b>	08/2009	Único	9	3	3,26	Manual	S.L
<b>Piloto 2</b>	09/ 2009	10 y 50 ml de inóculo	8	3	0,73 y 3,64	Agitador mecánico	F.Q.B
<b>Final</b>	11/ 2009	S y C	21	5	1,48	Burbujeo	S.L

En todos los experimentos se simularon las condiciones de un lago eutrófico durante la temporada estival. Los experimentos piloto tuvieron el objetivo de encontrar las condiciones más adecuadas para el crecimiento de la comunidad. El primero tuvo un solo tratamiento, mientras que el segundo contó con dos tratamientos, 10 y 50 ml de inóculo inicial (Tabla 1). El experimento final fue el de mayor duración y contó con dos tratamientos: una sucesión autogénica a modo de control (S) y uno donde la comunidad fue invadida con una cepa tóxica de la cianobacteria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* (C) (Tabla 1). A lo largo de la sucesión, se evaluó el crecimiento comunitario, la variación de los rasgos morfológicos de los organismos y el cambio en la biomasa de cada GFBM. A su vez se evaluaron los efectos de la introducción de *C. raciborskii* sobre sí misma y sobre la comunidad receptora.

### **Área de estudio y construcción de los inóculos**

El presente trabajo se llevó a cabo empleando muestras superficiales de 13

lagos artificiales de la Ciudad de la Costa, Canelones, Uruguay (Figura 3). Estos sistemas incluyen desde condiciones mesoeutróficas hasta hipereutróficas (Fabre *et al.*, 2010), de manera de representar a todos los GFBM. En todos los casos, las muestras de agua fueron filtradas con una malla de 50  $\mu\text{m}$  para eliminar el zooplancton de mayor tamaño y conservadas a baja temperatura e intensidad lumínica hasta su llegada al laboratorio. En el laboratorio, muestras de 250 ml de cada lago fueron mezcladas en un balón de mayor volumen, para crear el inóculo inicial, el cual fue aclimatado a la temperatura e intensidad de luz del experimento, y agitado de manera manual dos veces al día, hasta el inicio del mismo al día siguiente. Tres réplicas del inóculo fueron medidas en fluorómetro (Aquafluor; clorofila-a y ficocianina) y espectrofotómetro (Thermo; Absorbancia a 665, 440 y 750 nm). Luego fueron fijadas en solución lugol y conservadas para su posterior análisis en microscopio y comparación con otros momentos de la sucesión.

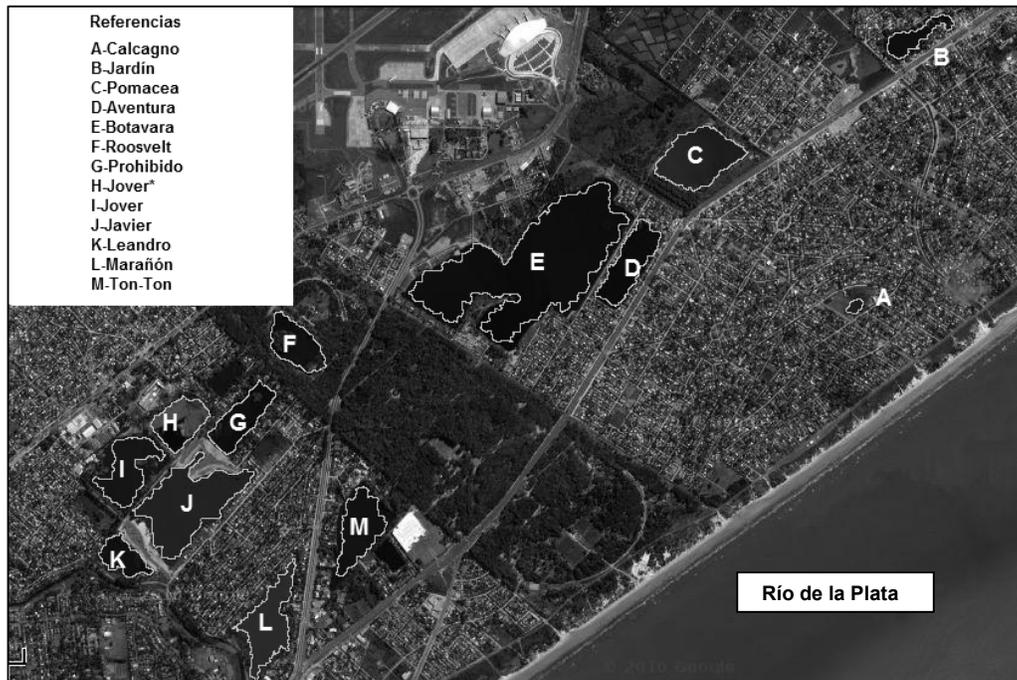
Para el experimento final se utilizó la cepa MVCC19 de *C. raciborskii*, la cual es potencial productora de toxinas (Piccini *et al.*, en prensa) y es cultivada por la sección Limnología. Este cultivo fue aclimatado desde el inicio de la sucesión hasta el noveno día bajo las mismas condiciones que el resto de las unidades experimentales, incluyendo el medio de cultivo. El volumen de cultivo inoculado fue de 3 ml, correspondiente a un biovolumen de *C. raciborskii* de  $0,021 \text{ mm}^3 \text{ L}^{-1}$ , con un valor de clorofila- a de 150 UFR.

### **Diseño experimental**

Los experimentos fueron realizados en frascos tipo Schott de 650 ml con medio WC, recomendado para el crecimiento de todos los grupos fitoplanctónicos en general (González *et al.*, 1995). La concentración de  $\text{PO}_4$  en el mismo fue de  $0,047 \text{ gL}^{-1}$ , mientras que la concentración de  $\text{NO}_3$  fue de  $0,627 \text{ gL}^{-1}$ . Todos los experimentos estuvieron a una temperatura de  $26 \text{ }^\circ\text{C}$  y un valor de radiación fotosintéticamente activa (RFA) de 60 a  $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . El fotoperíodo empleado fue de 16 horas luz-8 de oscuridad.

Durante el primer experimento piloto (agosto de 2009), se puso a prueba el medio de cultivo en la cámara de cultivo de la sección Limnología. Los frascos

fueron agitados manualmente dos veces al día durante todo el experimento. Debido a que en el mismo se alcanzó demasiado rápido la fase estacionaria del crecimiento fitoplanctónico (4 días) se decidió realizar un segundo experimento piloto. Este fue realizado en setiembre de 2009 para seleccionar una concentración inicial de inóculo de manera de obtener un tiempo de saturación del aumento de la biomasa adecuado. Dicho experimento fue llevado a cabo bajo condiciones de agitación constante (Tabla 1).



**Figura 3.** Fotografía digital de la zona de muestreo (Ciudad de la Costa, Canelones, Uruguay) donde se indican los lagos a partir de cuyas muestras de fitoplancton se construyó el inóculo de los experimentos (Modificada de Google Earth).

El experimento final, el principal en este trabajo, fue llevado a cabo en noviembre de 2009. En el tratamiento C, la comunidad fue inoculada con *Cylindrospermopsis raciborskii* al noveno día de sucesión. Se optó por inocular la comunidad al noveno día ya que en este momento el aumento de la biomasa mostró signos de alcanzar la fase estacionaria. En este experimento, el método de agitación fue la aireación con aire filtrado (Tabla 1).

## **Seguimiento de los experimentos**

### *Toma de muestras*

Se tomaron muestras diarias en todos los experimentos (15ml) bajo condiciones de asepsia para evaluación de biomasa total y para conteos, para lo cual fueron fijadas en solución lugol. Solamente en el experimento final se realizó reposición de medio de cultivo, la cual se llevó a cabo cada aproximadamente 5 días reponiendo 30 ml de medio.

### *Cambio global de la comunidad*

Se analizó diariamente el aumento de la biomasa de la comunidad fitoplanctónica mediante fluorometría y espectrofotometría. En fluorómetro se midió clorofila-a *in vivo* como estimador de la biomasa total del cultivo, y ficocianina, como indicador de cianobacterias. Los valores obtenidos fueron expresados en unidades de fluorescencia relativa (UFR). Se utilizó un espectrofotómetro para medir absorbancia a 665 (Abs<sub>665</sub>), 750 (Abs<sub>750</sub>) y 440 (Abs<sub>440</sub>) nm, expresada en unidades de absorbancia (ua) y para estimar clorofila-a, turbidez (que incluye todo tipo de partículas, tanto de origen autótrofo como heterótrofo) y para calcular el coeficiente de extinción de la luz del cultivo (Kd, m<sup>-1</sup>) respectivamente. El Kd se calculó según Kenesi *et al.* (2009):

$$Kd (m^{-1}) = (Abs_{440} (ua) \times 2,303) / z (m)$$

Donde z corresponde a la mitad de la altura de los frascos utilizados (0,18m). Se calculó además el cociente ficocianina/clorofila-a (Fico/cloro), para evaluar cambios relativos en la proporción de cianobacterias respecto al resto de los grupos presentes.

### *Evolución de la estructura comunitaria*

En el caso del primer experimento piloto, se llevó a cabo únicamente la medición del MLD (µm) de organismos elegidos al azar en los días 0, 4 y 9.

A partir de los valores obtenidos para la estimación de la biomasa para el segundo experimento piloto, se notó el decaimiento en la biomasa de varias muestras, por lo que se decidió no realizar un análisis exhaustivo de la composición y estructura comunitaria en tales unidades experimentales. En el

experimento final, se llevó a cabo el seguimiento de los rasgos morfológicos de los organismos, se realizaron conteos y se calculó el biovolumen de la comunidad fitoplanctónica. Estos análisis se llevaron a cabo en el inóculo (tres réplicas) y en la réplica 3 de S y réplica 1 de C en distintos momentos de la sucesión (días 4, 9, 13 y 21). En el caso del tratamiento C, se realizó específicamente el seguimiento del crecimiento de *C. raciborskii* en las réplicas 2 y 5, para los días 9, 10, 13, 15, 18 y 21.

Se estimó la abundancia de los organismos (individuos  $\text{ml}^{-1}$ ) utilizando la metodología de Utermöhl (1958), contando campos al azar. Las muestras sedimentaron durante aproximadamente 24 horas en cámaras de sedimentación Utermöhl o Sedwick-Rafter de diferente volumen, dependiendo de la concentración de organismos. El conteo fue llevado a cabo a tres aumentos 200X, 400X y 1000X, para así abarcar un mayor rango de tamaños sin pérdida de precisión. A 200X fueron contados y medidos los organismos de gran tamaño, principalmente aquellos de forma filamentosa. A 1000X fueron contados y medidos aquellos organismos menores a 5  $\mu\text{m}$ , así como el ancho de los filamentos contados previamente. El resto de los individuos fue contado y medido a 400X. El número de campos a contar bajo cada aumento fue determinado mediante una curva de rarefacción. En los casos donde, debido a la baja riqueza, la asíntota de dicha curva fue alcanzada en menos de tres campos, se contaron hasta 400 individuos de la especie más abundante de la muestra, obteniéndose así un error de conteo del 10% (Lund *et al.*, 1958).

Se registraron rasgos morfológicos de los organismos incluyendo la dimensión lineal máxima (MLD;  $\mu\text{m}$ ), la presencia de flagelos, mucílago, aerótopos, heterocitos y estructuras silíceas. Asimismo, se tomaron medidas de otras dimensiones (como ancho y profundidad) necesarias para calcular tanto el volumen ( $V$ ;  $\mu\text{m}^3$ ) como la superficie de los organismos ( $S$ ;  $\mu\text{m}^2$ ), y la relación superficie-volumen ( $S/V$ ,  $\mu\text{m}^{-1}$ ) siguiendo aproximaciones geométricas, de acuerdo con Hillebrand *et al.* (1999). Se evaluaron los rasgos de 30 individuos al azar de cada taxón a 200X y de 15 a 400X en todas las situaciones en que se encontraron suficientes ejemplares. A 1000X se midieron por lo menos 3 individuos de cada especie pequeña y 10 anchos en el caso de las especies filamentosas. El biovolumen ( $BV$ ;  $\mu\text{m}^3\text{L}^{-1}$ ) de los diferentes taxa fue calculado

multiplicando su abundancia por el volumen promedio de los organismos contados pertenecientes a la misma.

Los organismos observados en cada muestra fueron agrupados en clases taxonómicas: cianobacterias, clorofitas, crisofitas y diatomeas. Por otra parte, se realizó la clasificación de organismos en GFBM de acuerdo con Kruk *et al.* (2010). Finalmente, los organismos pertenecientes al mismo grupo taxonómico o GFBM fueron sumados.

### **Análisis de datos**

El número de taxa diferentes y GFBM presentes en distintos momentos de la sucesión fue evaluado empleando el índice de diversidad de Shannon- Weaver ( $H'$ , Shannon, 1948) únicamente para el tercer experimento.

Finalmente se evaluó el crecimiento de *C. raciborskii* desde su inoculación hasta el final del experimento. Se calculó la relación entre el BV de esta especie y el BV final de toda la comunidad, la clorofila-a y la ficocianina en las muestras C2 y C5 a lo largo del tiempo. Por otra parte se estimó un índice de invasibilidad (Sperfeld *et al.*, 2009) para *C. raciborskii*, en el cual se comparó el BV entre el día posterior a su introducción en el cultivo y el día en que concluyó el experimento, según la ecuación:

$$\text{Invasibilidad} = \text{Log}_2 (\text{BV}_{21}/\text{BV}_{10})$$

En la misma,  $\text{BV}_{21}$  y  $\text{BV}_{10}$  representan el biovolumen de *C. raciborskii* en los días 21 y 10 respectivamente. Este índice es una medida del crecimiento de la población de la especie invasora luego de ser inoculada. Valores mayores a 0 implican crecimiento de la especie introducida en cuanto a biomasa, y por lo tanto invasión por parte de la misma (Sperfeld *et al.*, 2009).

Debido a que el segundo experimento piloto no fue exitoso, solamente se analizaron los datos del primer experimento piloto y el experimento final. (Tabla 2). Se llevaron a cabo correlaciones no paramétricas de Spearman entre las variables clorofila-a, ficocianina, ficocianina/clorofila a,  $\text{Abs}_{665}$ ,  $\text{Abs}_{440}$ ,  $\text{Abs}_{750}$  y Kd. Este método fue elegido luego de comprobar que la distribución de las

mismas no cumplía en todos los casos con el supuesto de normalidad. Por otra parte, se evaluó la existencia de diferencias significativas en el cambio en los valores de los estimadores de biomasa, así como para el BV de *C. raciborskii*. Para ello se emplearon modelos lineales generales, particularmente análisis de varianza (ANOVA) de una vía y de medidas repetidas (Tabla 2). Previo a dichos análisis se pusieron a prueba la homocedasticidad y la normalidad en la distribución de los residuales de estas variables. En el primer caso se empleó la prueba de esfericidad, mientras que en el segundo se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov. Cuando los supuestos requeridos en los ANOVA no se cumplieron, se recurrió a la transformación de las variables, empleando los programas Microsoft Excel y STATISTICA 8.0.

**Tabla 2.** Análisis de datos realizados en el primer experimento piloto y el experimento final. Exp: experimento.

Exp	Análisis	Características	Factores y niveles	Variables analizadas y transformación utilizada
<b>Piloto 1</b>	Correlaciones	Spearman	-	Indicadores globales: sin transformar
	ANOVA	1 vía	Único tratamiento en el tiempo	Ficocianina: $\log_{10}$ Clorofila-a: $\log_{10}$ Abs <sub>750</sub> : Box- Cox
<b>Final</b>	Correlaciones	Spearman	-	Indicadores globales: sin transformar
	ANOVA	Medidas repetidas	C y S en el tiempo	Ficocianina, clorofila-a, Abs <sub>750</sub> : todos sin transformar
	ANOVA	1 vía	Único tratamiento en el tiempo	BV de <i>C. raciborskii</i> : sin transformar
	Kruskall-Wallis		VC y VS en el tiempo	V individual: $\log_{10}$

Para analizar los datos del primer experimento piloto, tanto como el crecimiento de *C. raciborskii* en el tercer experimento, se emplearon ANOVA de una vía, donde el factor fue el tiempo y los niveles fueron los nueve días que duró dicho experimento (Tabla 2). Se optó por este análisis debido a que en estos casos no hubo tratamientos a comparar, si no que se evaluaron los valores tomados por las variables a lo largo del experimento. Para este experimento la clorofila-a, ficocianina y ficocianina/clorofila fueron transformadas mediante logaritmo de base 10. Dicha transformación no fue exitosa con Abs<sub>750</sub>, por lo cual se utilizó una transformación de potencia de la familia Box-Cox (Box & Cox, 1964). En el tercer experimento, por contar con un tratamiento y un control en el tiempo, se

emplearon ANOVA de medidas repetidas. Los factores de este análisis fueron tiempo y tratamiento, con 21 y 2 niveles cada uno. En este caso, ninguna de las variables requirió ser transformada. Por último, la existencia de diferencias significativas en los valores de V individual de los organismos entre tratamientos C y S a lo largo del tiempo fue analizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Tabla 2). Todos estos análisis fueron realizados empleando el programa STATISTICA versión 8.0, mientras que los gráficos para dicha variable fueron creados utilizando el programa R, versión 2.12.2.

## RESULTADOS

### ***Primer experimento piloto***

#### *Cambio comunitario global*

Todas las variables analizadas (clorofila-a, ficocianina, Fico/Cloro, Abs<sub>665</sub>, Abs<sub>440</sub> y Abs<sub>750</sub>) variaron conjuntamente (prueba de Spearman, Tabla 4) aumentando significativamente en el tiempo especialmente a partir del cuarto día del experimento (Tabla 4, Figura 4). Dada la alta correlación entre las variables estimadas mediante espectrofotometría se optó por analizar en detalle únicamente la Abs<sub>750</sub> como indicadora de biomasa, junto con la clorofila-a y la ficocianina.

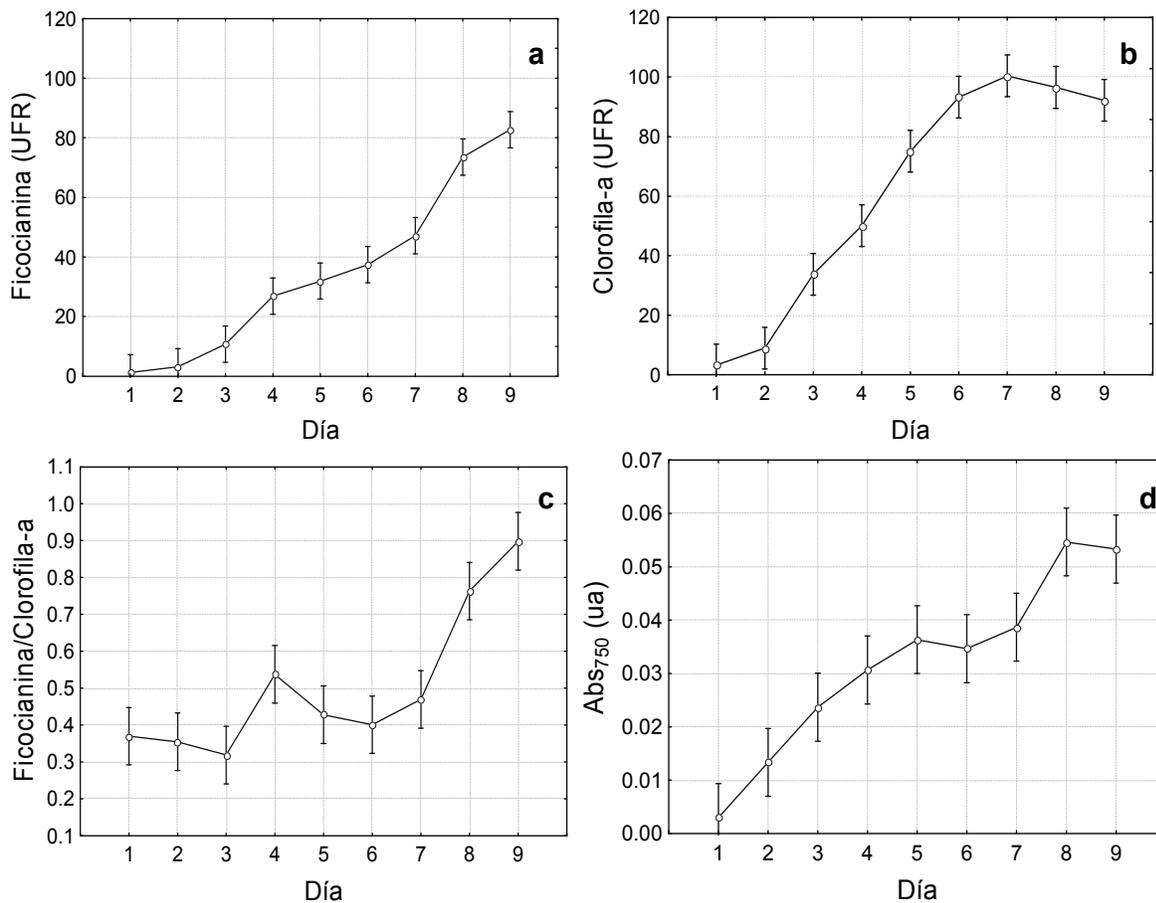
La clorofila-a aumentó estabilizándose hacia el sexto día, alcanzando un valor máximo de 100 UFR en el séptimo, con un decaimiento al final del experimento que no resultó significativo (Figura 4a). La ficocianina también aumentó pero de modo más lento (Figura 4b). La relación ficocianina/clorofila-a se mantuvo baja durante los 3 primeros días, luego se produjo un pico en el día 4 con un nuevo decaimiento para volver a crecer y alcanzar el valor máximo de 0,9 al día 9 (Figura 4c).

**Tabla 3.** Resultados del test no paramétrico de correlación de rangos de Spearman para el primer experimento piloto. Las correlaciones se consideran significativas a  $p < 0,05$  y se marcan con asterisco (\*).

	Ficocianina	Fico/Cloro	Abs <sub>665</sub>	Abs <sub>440</sub>	Abs <sub>750</sub>	Kd (m <sup>-1</sup> )
Clorofila-a (UFR)	0,90*	0,60*	0,89*	0,87*	0,83*	0,87*
Ficocianina (UFR)	1,00	0,79*	0,98*	0,97*	0,94*	0,97*
Fico/Cloro		1,00	0,75*	0,77*	0,73*	0,77*
Abs <sub>665</sub> (ua)			1,00	0,99*	0,97*	0,99*
Abs <sub>440</sub> (ua)				1,00	0,982*	1,00*
Abs <sub>750</sub> (ua)					1,00	0,98*
Kd (m <sup>-1</sup> )						1,00

**Tabla 4.** Resultados del ANOVA de una vía para los estimadores de biomasa por espectrofotometría y fluorometría del primer experimento. La existencia de diferencias significativas se señala con asterisco (\*), grados de libertad: 8.

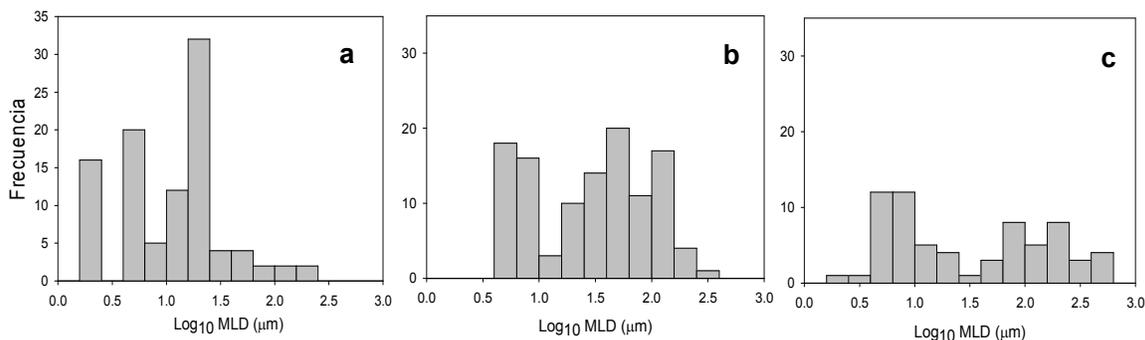
Variable	F	p
Clorofila-a (UFR)	669,40	<0,001*
Ficocianina (UFR)	500,56	<0,001*
Fico/Cloro	28,18	<0,001*
Abs <sub>750</sub> (ua)	38,20	<0,001*



**Figura 4.** Estimadores de biomasa por fluorometría y espectrofotometría en función del tiempo para el primer experimento piloto: **a**-Clorofila-a (UFR); **b**-Ficocianina (UFR); **c**-Ficocianina/Clorofila; **d**- Abs<sub>750</sub> (ua). Los símbolos representan la media y las barras verticales muestran intervalos de confianza de 0.95.

### *Evolución de la estructura comunitaria*

En el primer experimento el MLD medio de los organismos aumentó en el tiempo. Se encontró una mayor frecuencia de organismos de mayor talla con el avance de la sucesión siendo aún más importante en el último día de la misma (Figura 5).



**Figura 5.** Histogramas del logaritmo en base 10 de la dimensión lineal máxima (MLD,  $\mu\text{m}$ ) para el tiempo inicial (a), el cuarto (b) y el noveno día de la sucesión (c) del primer experimento.

### **Experimento final**

#### *Cambio comunitario global*

Al igual que en el experimento anterior todas las variables estuvieron correlacionadas positivamente (Tabla 5) y aumentaron en el tiempo (Tabla 6). La menor correlación se encontró entre ficocianina/clorofila y clorofila-a. Tanto en el tratamiento con inoculación de *Cylindrospermopsis raciborskii* (C) como en el control (S) se produjo un aumento significativo en todas las variables estudiadas a lo largo del experimento (Tabla 6, Figura 6). El aumento de la clorofila-a fue notorio a partir del día 4, enlenteciéndose a partir del día 7, con un decaimiento en los últimos 3 días del experimento (Figura 6). Hubo diferencias significativas entre los tratamientos S y C para todas las variables, excepto en el aumento de la relación ficocianina/clorofila-a (Tabla 6). El aumento de la biomasa y demás variables fue mayor en S que en C, donde decayó a partir del noveno día. El pico máximo de biomasa fue alcanzado en el día 18 en ambos casos (Figura 6). El aumento de la ficocianina fue menor al de la clorofila-a, hasta el séptimo día donde la ficocianina presentó valores más altos (Figura 6 a y b).

**Tabla 5.** Resultados del test no paramétrico de correlación de rangos de Spearman entre las variables para el experimento final. Las correlaciones se consideran significativas a  $p < 0,05$  y se marcan con asterisco (\*).

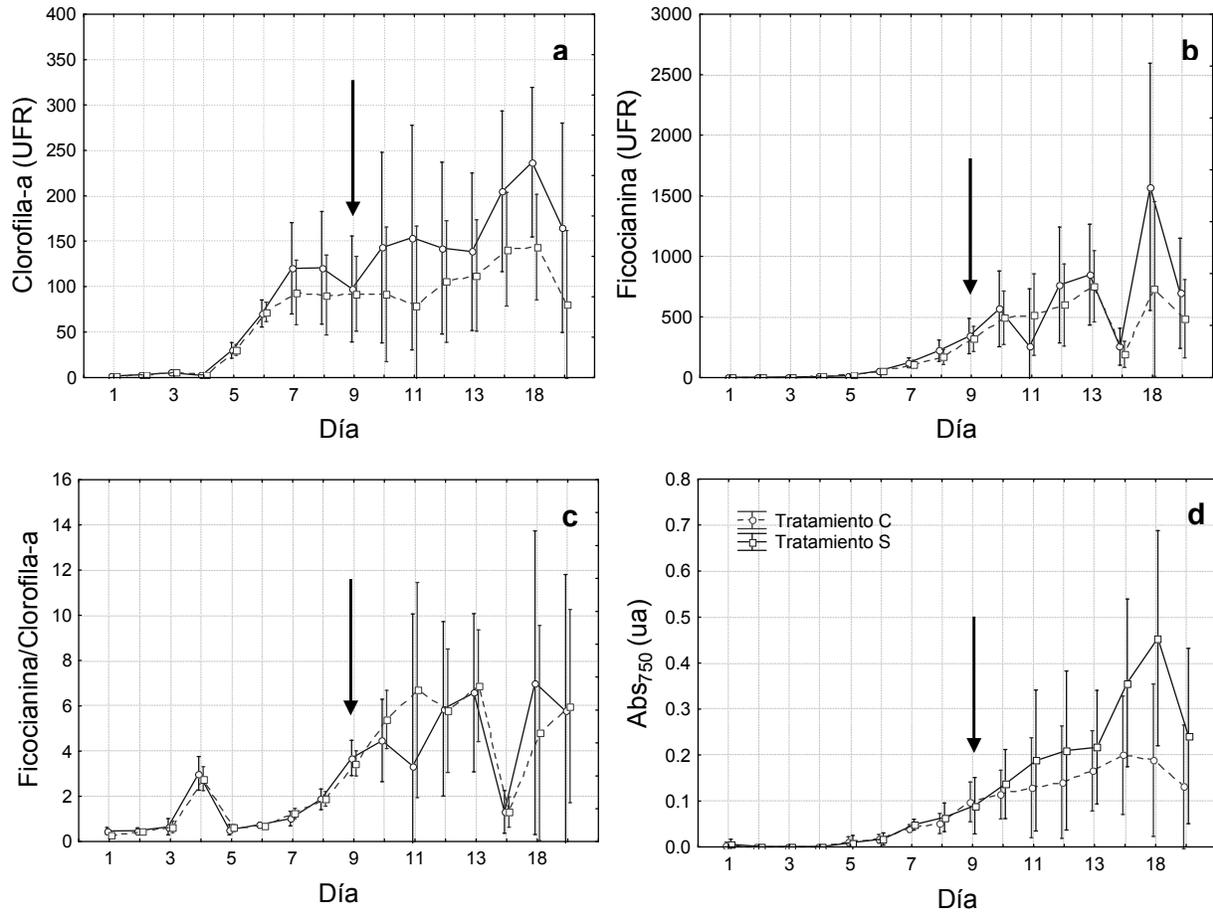
	Ficocianina (UFR)	Fico/Cloro	Abs <sub>665</sub> (ua)	Abs <sub>750</sub> (ua)	Kd (m <sup>-1</sup> )
<b>Clorofila-a (UFR)</b>	0,80*	0,48*	0,86*	0,86*	0,85*
<b>Ficocianina (UFR)</b>	1,00	0,87*	0,90*	0,91*	0,90*
<b>Fico/Cloro</b>		1,00	0,68*	0,69*	0,69*
<b>Abs<sub>665</sub> (ua)</b>			1,00	0,99*	0,99*
<b>Abs<sub>750</sub> (ua)</b>				1,00	0,99*
<b>Kd (m<sup>-1</sup>)</b>					1,00

**Tabla 6.** Resultados de los ANOVAs de medidas repetidas para los estimadores de biomasa del experimento final. La existencia de diferencias significativas se señala con asterisco (\*), grados de libertad: 15.

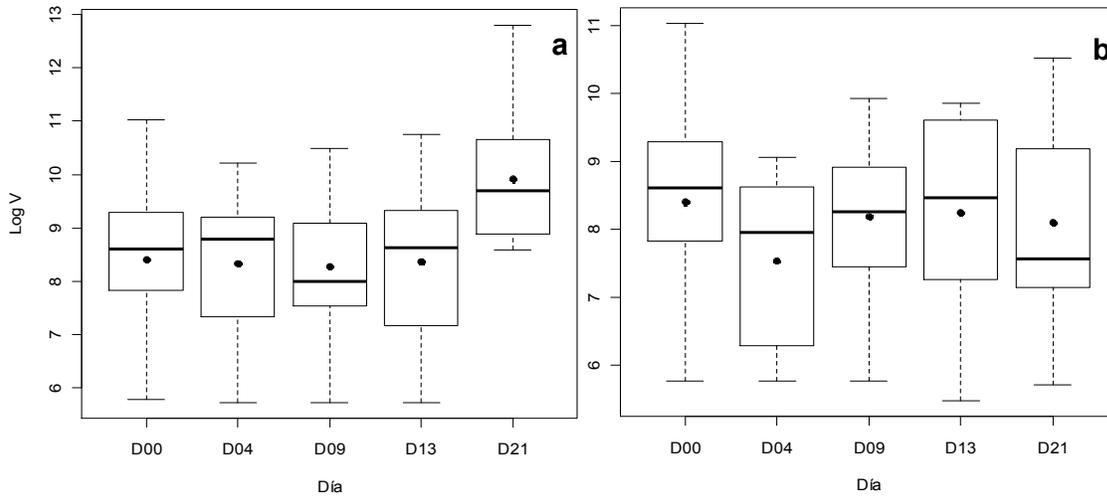
Variable	Tiempo		Interacción Tiempo-Tratamiento	
	F	p	F	p
<b>Clorofila-a (UFR)</b>	25,14	0,00	1,88	0,04*
<b>Ficocianina (UFR)</b>	19,93	0,00	2,13	0,02*
<b>Fico/Cloro</b>	14,27	0,00	0,73	0,74
<b>Abs<sub>750</sub> (ua)</b>	21,25	0,00	2,71	0,00*

### *Variación de la morfología*

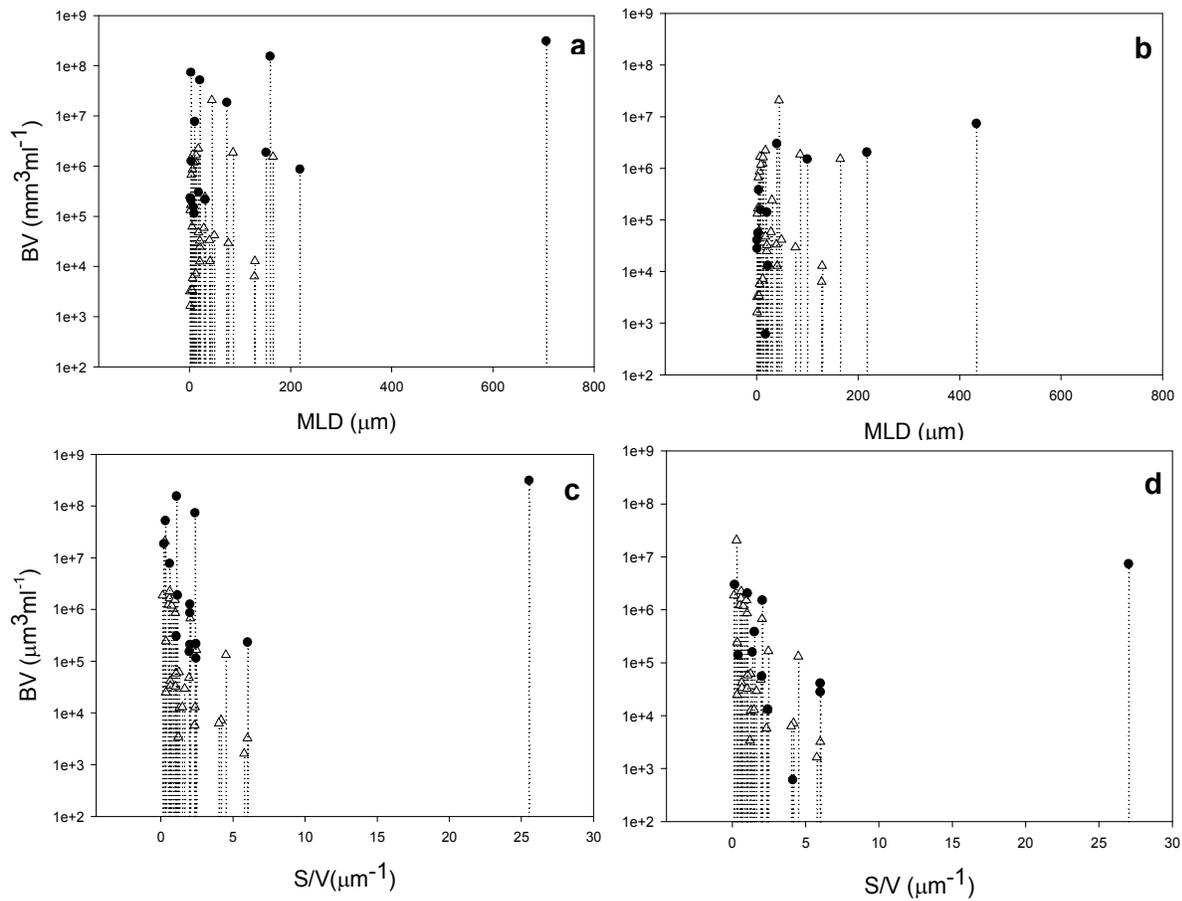
El volumen individual promedio de los organismos por muestra aumentó significativamente con respecto al inóculo en S (Kruskal-Wallis;  $H(4,86)=13.9$ ,  $p=0.007$ ). Sin embargo, no hubo cambios significativos en el volumen en C (Kruskal-Wallis;  $H(4,74)=4.7$ ,  $p=0.319$ ) (Fig. 7). En el inóculo, el MLD de los organismos presentó valores menores a 200  $\mu\text{m}$ . En ambos tratamientos, la variación del BV comunitario en función del MLD para el día 21 mostró un aumento de esta dimensión con respecto al inóculo. En este momento, en S, fue mayor la proporción de organismos en alcanzar valores altos de MLD (superiores a 600 $\mu\text{m}$ ) (Figura 8 a y b). La relación S/V en el inóculo nunca presentó valores mayores a 10  $\mu\text{m}^{-1}$ . La porción más alta del BV tuvo una S/V menor a 5  $\mu\text{m}^{-1}$ . Tanto en S como en C, la relación S/V se mantuvo similar al inóculo, pero registrando valores de S/V cercanos a 25 como máximo (Figura 8 c y d).



**Figura 6.** Variación temporal de: a- Clorofila-a (UFR); b-Ficocianina (UFR); c- Ficocianina/Clorofila; d-Absorbancia a 750 nm (ua) para S (control, línea continua) y C (inoculación de *C. raciborskii*, línea punteada). Los símbolos representan la media de las variables mientras que las barras verticales representan intervalos de confianza de 0,95. El momento de la invasión con *C. raciborskii* se indica con una flecha.



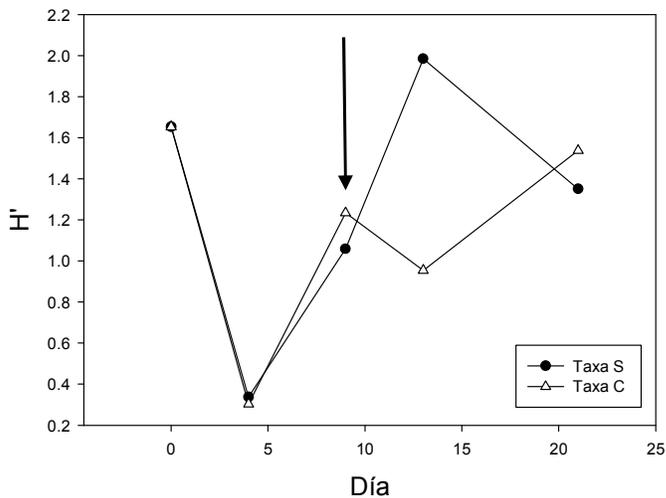
**Figura 7.** Logaritmo en base 10 del volumen individual ( $\mu\text{m}^3$ , Log V) del fitoplancton a lo largo de la sucesión para: a-Tratamiento S; b:- Tratamiento C. Los puntos representan la media, las líneas horizontales la mediana. Los márgenes inferior y superior de los rectángulos indican el primer y tercer cuartil respectivamente. Las líneas verticales representan la distancia intercuartil.



**Figura 8.** Biovolumen (BV,  $\mu\text{m}^3\text{ml}^{-1}$ ) en función de dimensión lineal máxima (MLD,  $\mu\text{m}$ , arriba) y de relación superficie-volumen (S/V,  $\mu\text{m}^{-1}$ , abajo) para: a- Inóculo (triángulos blancos) y día 21 de S (círculos negros); b- Inóculo (triángulos blancos) y día 21 de S (círculos negros). S: control y C: inóculo con *C. raciborskii*. El eje Y se encuentra representado en escala logarítmica en base 10.

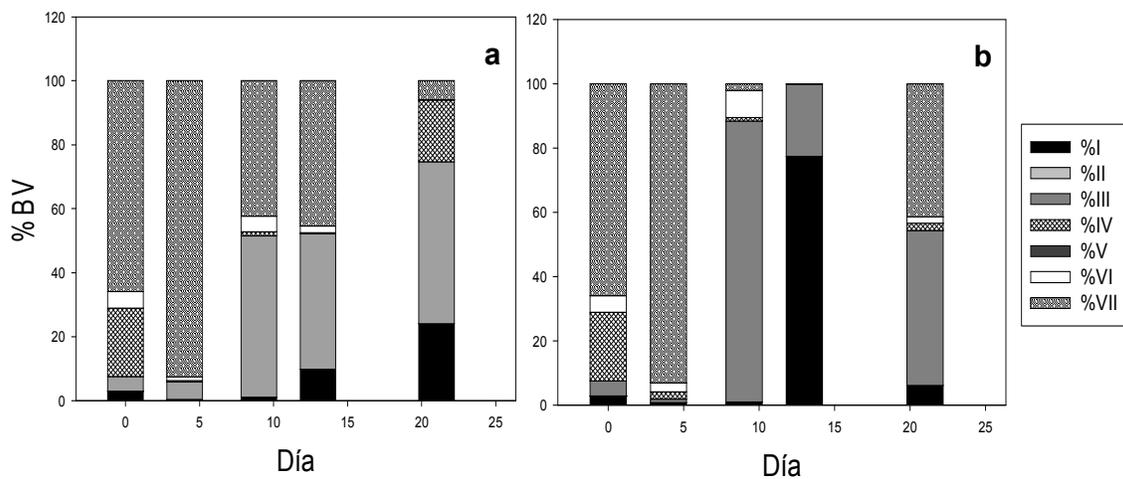
### *Evolución de la estructura comunitaria*

Los patrones de cambio en la diversidad fueron similares empleando tanto GFBM como grupos taxonómicos, llegando la diversidad en términos de GFBM a alcanzar mayores valores de  $H'$  finales. La diversidad taxonómica y la funcional presentaron una caída en el día cuatro, mostrando un aumento hacia el final del experimento. En S, el pico de diversidad se produjo en el día 13. En cambio, en C se notó un aumento de  $H'$  al comparar los días 13 y 21 (Figura 9). Se encontraron claras diferencias en cuanto a la variación de la composición de GFBM a lo largo de la sucesión y respecto del inóculo. En el inóculo se encontraron cinco GFBM, siendo dominantes en BV los grupos IV y VII.



**Figura 9.** Índice de diversidad de Shannon ( $H'$ ) para el número de taxa a lo largo del experimento. S se marca con puntos negros, C, con triángulos blancos. El momento de la invasión con *C. raciborskii* se indica con una flecha.

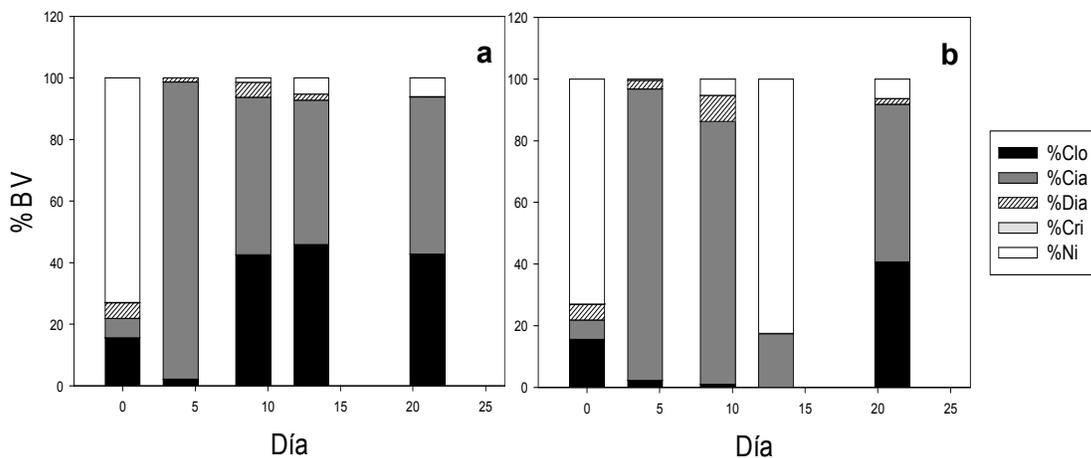
En el tratamiento control (S) el GFBM VII fue dominante en el cuarto día, con un 92%, en los días 9 y 13 aumentó el GFBM I y pasó a representar un 40% conjuntamente con el GFBM III. Este último pasó a ser dominante al final del experimento (mayoritariamente *Planktothrix agardhii*, acompañada por *Pseudanabaena* sp.) con un BV correspondiente al 50% del total. Al final de la sucesión el GFBM III estuvo acompañado por los GFBM I y IV, ambos representando aproximadamente un 20% del total. En cambio, el GFBM VII, inicialmente dominante, bajo finalmente a un 6% (Figura 10).



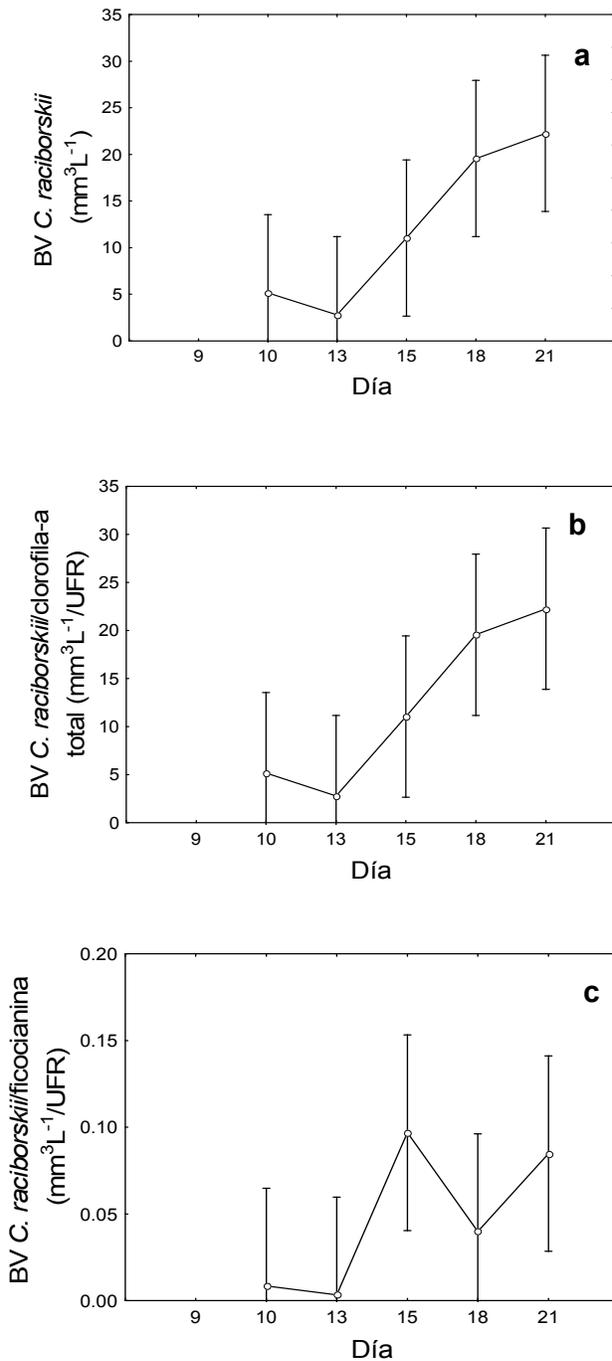
**Figura 10.** Porcentaje del BV total ( $\text{mm}^3 \text{L}^{-1}$ ) representado por los diferentes GFBM identificados en: a- S (control) y b- C (tratamiento con inoculación de *C. raciborskii*) en cinco momentos de la sucesión (Días 0, 4, 9, 13, y 21).

En el tratamiento con inoculación de *C. raciborskii* (C) el GFBM VII también fue dominante (93% del BV total) durante los primeros días de la sucesión. En el día 9, el GFBM III pasó a ocupar el lugar del grupo VII en cuanto a BV. Luego de pasar por una disminución en su BV y la dominancia abrupta del GFBM I en el día 13, al final del experimento el GFBM III (siendo la especie más abundante *Pseudanabaena* sp.) dominó la comunidad junto con el GFBM VII (48 y 41% del BV total respectivamente) (Figura 10).

En cuanto a grupos taxonómicos, se reconocieron cianobacterias, clorofitas y diatomeas como los grupos con mayor biovolumen en todos los casos. El resto de los organismos fue clasificado como crisofitas o no identificado, siendo estos más abundantes en el inóculo y en el día 13 de la réplica 1 del tratamiento C. A excepción de esta réplica, el BV de cianobacterias fue mayor con respecto al resto de los grupos en S y C a lo largo de la sucesión y al final de la misma (Figura 11).



**Figura 11.** Composición de la comunidad a lo largo de la sucesión (Días 0, 4, 9, 13, y 21). Porcentaje de biovolumen total (BV %) representado en base a grupos taxonómicos en: a- S (control) y b- C (tratamiento con inoculación de *C. raciborskii*). Clo: clorofitas; Cia: cianobacterias; Dia: diatomeas; Cri: crisofitas; Ni: no identificado.



**Figura 12.** Aumento de la biomasa de *C. raciborskii* en la sucesión a partir de su inoculación. a- biovolumen *C. raciborskii* (BV, mm<sup>3</sup>L<sup>-1</sup>); b- relación BV *C. raciborskii*/clorofila-a total (mm<sup>3</sup>L<sup>-1</sup>/UFR; c- relación BV *C. raciborskii* /ficocianina (mm<sup>3</sup>L<sup>-1</sup>/UFR). Se muestra la evolución de las 3 variables a lo largo del experimento final.

### Desarrollo de *Cylindrospermopsis raciborskii*

El inóculo de *C. raciborskii* introducido en la comunidad al noveno día no creció por igual en todas las réplicas del tratamiento. Entre las tres réplicas que prosperaron de las cinco del tratamiento, C1, C2 y C5, *Cylindrospermopsis* creció solamente en las dos últimas. Los resultados del ANOVA de una vía para estas dos réplicas indicaron la existencia de diferencias significativas en el BV de esta cianobacteria entre los días de inoculación (día 9) y de finalización de experimento (día 21) (F=7.11, p=0.017) (Figura 12 a), produciéndose un aumento del mismo durante este lapso de tiempo. Al mismo tiempo hubo un aumento significativo en la relación BV *C. raciborskii*/clorofila-a total (F=7.11, p=0.017) en el tiempo (Figura 12b). Contrariamente, la relación BV *C. raciborskii*/ficocianina total no mostró diferencias significativas en el tiempo (F=3.46, p=0.081) (Figura 12c). Finalmente, el índice de invasibilidad de *C. raciborskii* fue 2.11 (1.1 a 3.9, mínimo y máximo respectivamente).

## DISCUSIÓN

Este trabajo es el primer paso hacia la validación experimental de la respuesta temporal del fitoplancton en términos de grupos funcionales basados en morfología (Kruk *et al.* 2010). Este tipo de validación es fundamental para que este sistema de clasificación, junto con modelos matemáticos de crecimiento fitoplanctónico pueda ser empleado como herramienta predictiva. De esta manera será posible, por ejemplo, predecir la ocurrencia de GFBM que contengan organismos potencialmente nocivos para la calidad de las aguas, tales como *C. raciborskii*.

A lo largo de la sucesión, la biomasa comunitaria aumentó y el GFBM III pasó a ser dominante. El mismo está compuesto por cianobacterias filamentosas con aerótopos, de alto MLD y S/V, características que favorecen su desarrollo en sistemas eutróficos y durante el verano (Kruk *et al.*, 2010). La sucesión autogénica de GFBM coincidió con trabajos previos en cuanto a especies (Sommer, 1981; Sommer *et al.*, 1986) o grupos funcionales (Reynolds *et al.*, 2002), así como con observaciones de campo y simulaciones para GFBM (Segura *et al.*, 2010a).

Por otra parte, la combinación de una aproximación experimental comunitaria y el uso de GFBM nos permitió evaluar un posible escenario de invasión por parte de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Se encontraron respuestas inesperadas, *C. raciborskii* no llegó a dominar totalmente los ensamblajes al final de la sucesión, alcanzándose un estadio final de coexistencia.

### **Sucesión de GFBM y variación de rasgos morfológicos**

La biomasa fitoplanctónica aumentó significativamente en el tiempo, lo que se debió al aumento en la abundancia de organismos de gran tamaño al final de la sucesión, lo cual coincide con estudios previos (Reynolds, 1984; Lampert & Sommer, 2007). Asimismo, dicho cambio fue observado en todos los experimentos y tratamientos, y considerando todas las variables globales estimadas (clorofila-a, Abs<sub>665</sub> y Abs<sub>750</sub>). Sin embargo, existieron diferencias particulares entre los estimadores. El aumento de la clorofila-a se produjo de

manera más rápida que el de la ficocianina, hecho que indicaría un crecimiento tardío de las cianobacterias (Reynolds, 1984), grupo del cual es indicador esta variable. Por otro lado, se observó un aumento de la turbidez y el  $K_d$  ( $m^{-1}$ , coeficiente de atenuación de la luz en el cultivo) lo cual refleja una disminución de la radiación fotosintéticamente activa para el fitoplancton. Sin tomar en cuenta la potencial influencia del zooplancton menor a 50  $\mu m$ , presente en ambos tratamientos, la intensidad de la luz sería el factor condicionante para el desarrollo comunitario hacia el final de la sucesión. Dicha condición sería resultado del crecimiento de la biomasa algal, por lo cual la comunidad sufriría de autosombreamiento (Scheffer, 1998). Lo observado en nuestros experimentos coincide con lo que ocurre en sucesiones autogénicas de sistemas naturales eutróficos (Kruk *et al.*, 2002).

A lo largo de la sucesión se observó un aumento del MLD, V y S de los organismos. Altos valores de estos rasgos son característicos de organismos tipo K (Margalef, 1978), quienes resultan eficaces competidores cuando los recursos comienzan a ser limitantes, lo cual ocurre en el ambiente en el estadio final de una sucesión (Reynolds, 1984; Reynolds, 1997). La luz como recurso limitante podría explicar que la relación S/V se haya mantenido en valores similares a los del inóculo y que los GFBM I y III hayan sido los dominantes. El GFBM I está constituido por organismos pequeños con alta S/V, mientras que el GFBM III presenta alta S/V debido a su forma filamentosa (Kruk *et al.*, 2010). Una mayor S/V les confiere una mayor superficie para la captación de RFA por unidad de volumen, lo cual constituye una ventaja competitiva a los integrantes de estos GFBM bajo las condiciones de baja disponibilidad de luz (Kirk, 1994; Reynolds *et al.*, 2002; Litchman *et al.*, 2007; Schwaderer *et al.*, 2011). Además los organismos del GFBM III presentan aerótopos que les facilitan la flotación y regulación de la posición en la columna de agua (Graham *et al.*, 2009), también favoreciendo la captación de luz (Kirk, 1994; Huisman *et al.*, 2004).

El cambio temporal de la comunidad estudiada coincide con lo observado en la sucesión de fitoplancton del lago Rodó, donde al final de la misma también se observó la dominancia de una especie del GFBM III (*Planktothrix agardhii*), siendo la luz uno de los principales factores condicionantes en este caso (Kruk *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, estas observaciones coinciden con la hipótesis

del tercer estado estable, propuesta por Scheffer *et al.* (1997). Según la misma las cianobacterias pertenecientes a la familia Oscillatoriaceae, a la cual pertenece *Planktothrix agardhii*, son quienes dominan en lagos someros eutróficos con baja intensidad lumínica. En estas condiciones se produce un fenómeno de retroalimentación positiva, ya que ellas a su vez mantienen dicho ambiente lumínico, lo que favorece su permanencia al excluir a otras algas con mayores requerimientos de este recurso (Scheffer *et al.*, 1997; Scheffer, 1998).

En todos los experimentos y tratamientos se alcanzó la dominancia del GFBM III al final de la sucesión. Sin embargo, la especie más abundante no fue la misma en todos los casos, sino que la composición final fue variable e incluyó a *Planktothrix agardhii*, *Pseudanabaena* sp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena* sp. y *Aphanizomenon* sp., presentando las dos últimas una menor biomasa. Estas especies, por ser parte del mismo GFBM, comparten rasgos que las hacen similares en su respuesta al ambiente, y cualquiera de ellas se podría encontrar dominando hacia el final de la sucesión. Este resultado refuerza la aproximación de GFBM para clasificar al fitoplancton, que indica que los organismos en cada grupo son funcionalmente equivalentes y por lo tanto intercambiables (Kruk, 2010). En este sentido, y dado que dentro de una misma especie pueden existir cepas con distintas preferencias en cuanto a luz (diferentes constantes de subsaturación de luz,  $I_k$ ) en cepas de *C. raciborskii* (Fabre, 2011), para definir el desenlace de la sucesión la afiliación taxonómica no sería tan importante como la posesión de rasgos morfológicos que resulten beneficiosos ante determinadas condiciones ambientales.

Existen pocos trabajos que evalúen la diversidad funcional, menos aún la diversidad morfo-funcional en un lago eutrófico. Sin embargo, se pueden comparar nuestros resultados con datos de diversidad específica para el Lago Rodó, donde tampoco se notaron patrones claros de disminución de la diversidad a lo largo de la sucesión (Kruk, 2001). En este trabajo, al comparar la diversidad taxonómica con la funcional, los mayores valores de esta última podrían deberse a que varios GFBM pueden incluir a organismos pertenecientes a un mismo grupo taxonómico. Por ejemplo en el caso de las cianobacterias, quienes pueden encontrarse dentro de los GFBM I, III, IV y VII (Kruk *et al.*, 2010). Por otra parte, emplear GFBM en la clasificación de

organismos permitió la categorización de individuos considerados no identificados empleando taxonomía, obteniéndose así una mayor cantidad de GFBM.

### **Invasión con *Cylindrospermopsis raciborskii***

La inoculación de *Cylindrospermopsis raciborskii* generó un menor aumento de biomasa acumulada de la comunidad fitoplanctónica. Este efecto negativo podría deberse a la potencial producción de aleloquímicos con acción inhibidora de la fotosíntesis, lo que ha sido propuesto para *C. raciborskii* (Figueredo *et al.*, 2007). Las sustancias alelopáticas (toxinas u otros químicos) son metabolitos secundarios capaces de afectar el crecimiento de competidores (Leflaive & Ten-Hage, 2007). Asimismo, tanto condiciones de eutrofia (Graneli *et al.*, 2008; Gross, 2003) como de alta densidad de células productoras y blanco (Graneli *et al.*, 2008) podrían haber incentivado la producción de sustancias alelopáticas durante el experimento. Sin embargo, no se conoce evidencia de que células intactas liberen concentraciones significativas de aleloquímicos al medio (Gross, 2003), por lo cual *C. raciborskii* debería haber sufrido de lisis celular. Además esta especie, y en particular la cepa inoculada, producen además saxitoxina (Vidal *et al.*, 2009; Piccini *et al.*, en prensa). Sin embargo, si las cianotoxinas pueden también cumplir un papel similar a las sustancias alelopáticas es aún tema de debate (Gross, 2003).

El enlentecimiento en el aumento de la biomasa global podría haber significado una ventaja para *C. raciborskii*, pudiendo eliminar o hacer menos abundantes a sus potenciales competidores. A pesar de ello, los resultados de este trabajo mostraron que *Cylindrospermopsis* no logró ser la especie dominante de la comunidad no pudiendo superar el 50% de la biomasa total. Por el contrario, en los tratamientos donde sobrevivió llegó a la coexistencia con otras especies del GFBM III al final de la sucesión. Sin embargo, que *C. raciborskii* no haya dominado la sucesión no significa que su proceso de invasión no fuese exitoso. Ya que, tal como lo indica el índice de invasibilidad, hubo crecimiento poblacional y esta cianobacteria logró establecerse en la comunidad (Sperfeld *et al.*, 2009).

Según MacDougall (2009) el resultado del proceso de invasión dependería tanto de diferencias de nicho como de adecuación biológica entre la especie invasora y la comunidad residente. En este caso la especie invasora logra la coexistencia sin llegar al desplazamiento de la comunidad residente. Las diferencias en el nicho incluyen la explotación de diferentes recursos por parte del invasor y la comunidad residente, o la utilización de un mismo recurso mediante diferentes estrategias (ej. fijación de  $N_2$  atmosférico por *C. raciborskii*). En cambio, la existencia de diferencias en la adecuación biológica implica el grado de éxito que puede tener cualquiera de ellos a la hora de captar el mismo recurso y lograr un aumento poblacional (ej. mejor capacidad en la captación de luz gracias a su alta S/V). El grado de diferencias en estos aspectos entre el invasor y la comunidad residente podrá generar desde la dominancia del invasor sobre la comunidad, hasta la repulsión de la especie invasora por la comunidad, siendo también la coexistencia entre ambas un escenario factible.

En estos términos, la ausencia de dominancia podría estar explicada por la existencia de diferencias entre la especie invasora y la comunidad. Si bien *C. raciborskii* se caracteriza por su tolerancia a condiciones de sombreado y por lo tanto estas hubiesen favorecido su dominio (Padisák, 1997; Bouvy *et al.*, 1999; Briand *et al.*, 2004), otras condiciones del experimento pueden no haber sido las ideales para esta especie. La temperatura se dice es la principal variable que explica el crecimiento de *Cylindrospermopsis* (Mehnert *et al.*, 2010), con un óptimo de 28°C (Briand *et al.*, 2004, Mehnert *et al.*, 2010), y un rango “cercano al óptimo” de 25 a 35°C (Briand *et al.*, 2004). El valor de temperatura utilizado en el experimento fue de 26°C, lo cual podría estar explicando el hecho de que *C. raciborskii* no haya dominado la comunidad. Sin embargo, existen casos donde *C. raciborskii* logra la dominancia a temperaturas diferentes del óptimo (Bouvy *et al.*, 1999; Fabre *et al.*, 2010). Por otra parte, este valor de temperatura se encuentra cerca del máximo registrado para los sistemas lénticos de nuestro país (Kruk & De León, 2002; Kruk *et al.*, 2006; Fabre *et al.*, 2010; Pacheco *et al.*, 2010; Rodríguez-Gallego *et al.*, 2010), de donde fue aislada esta cepa (Piccini *et al.*, en prensa). Además, esta especie podría ser una fuerte competidora a bajas concentraciones de

nitrógeno ya que puede fijarlo y tiene gran afinidad por el amonio (Padisák, 1997). Por otro lado, tiene alta capacidad de captación de fosfato cuando es limitante y puede almacenarlo (Padisák, 1997; Isvánovics *et al.*, 2000; Piccini *et al.*, en prensa). Considerando estas características de *Cylindrospermopsis*, la temperatura no óptima y la ausencia de limitación por nutrientes podrían haber creado un escenario que no le confirió ventajas significativas sobre el resto del GFBM III.

Sperfeld *et al.* (2009) encontraron que *C. raciborskii* logró invadir comunidades fitoplanctónicas bajo distintas condiciones, aunque los valores de invasibilidad medidos fueron mayores a los alcanzados en este trabajo (entre 4 y 6). Dichos autores realizaron diferentes tratamientos, entre ellos incluir la presencia o no de herbivoría y concentraciones de nutrientes bajas y altas (siendo esta última condición, similar a la recreada en nuestro estudio). Para estos autores, la herbivoría fue uno de los factores más importantes a la hora de regular el proceso de invasión por parte de *C. raciborskii*. Junto con la alta carga de nutrientes, la depredación por parte de zooplancton generalista impediría la dominancia de esta cianobacteria, aumentando el reciclado de nutrientes y disminuyendo la intensidad de la competencia. Bajo estas condiciones de abundancia de nutrientes, el fitoplancton pequeño, capaz de proliferar a pesar de la predación gracias a sus altas tasas de crecimiento se vería beneficiado según estos autores. Esto contradeciría lo esperado para una sucesión en presencia de zooplancton de gran tamaño (Modelo Grupo de Ecología en Fitoplancton, Sommer *et al.*, 1986), el cual depredaría al fitoplancton pequeño permitiendo así el crecimiento de especies de gran tamaño como *C. raciborskii*

Otra teoría que permitiría explicar la coexistencia de especies es la teoría de neutralidad emergente (Segura *et al.*, 2010b; Scheffer & van Nes, 2009). A diferencia de lo propuesto por MacDougall *et al.* (2009), que para la coexistencia hace necesarias las diferencias de nicho, esta teoría propone que el invasor y la comunidad invadida pueden ser similares y sin embargo coexistir. De esta manera, se alcanza la coexistencia de especies debido a que las mismas pertenecen a un mismo grupo funcional, resultando funcionalmente equivalentes (Scheffer & van Nes, 2006). Por lo tanto, aplicar esta teoría y asumir tal equivalencia iría en contra de la hipótesis propuesta inicialmente en

este trabajo, según la cual *C. raciborskii* presenta características que la vuelven diferente al resto de los integrantes del GFBM III.

Dentro de un marco teórico que no toma en cuenta a la competencia, Aubriot *et al.*, (2011) encontraron que la coexistencia estable puede lograrse gracias a la flexibilización de la captación fosfato ante las fluctuaciones ambientales en las concentraciones del mismo. Gracias a su capacidad de ajustarse a las condiciones del medio, diferentes especies de fitoplancton alcanzarían un umbral similar para la captación de este recurso y eso las volvería funcionalmente similares. De esta manera la competencia directa disminuiría, dando lugar a una mayor diversidad. Si bien en nuestro estudio se propuso a la luz en lugar del fosfato como posible recurso limitante y las conclusiones de Aubriot *et al.* (2011) no podrían ser particularmente aplicadas a este caso, la plasticidad fenotípica en cuanto a la captación de otros recursos podría aportar a la explicación de la coexistencia entre *C. raciborskii* y la comunidad invadida. Por lo tanto, dicho trabajo ofrecería una visión distinta al momento de explicar la coexistencia de numerosas especies, dado que las teorías mencionadas anteriormente asumen la existencia de competencia entre los integrantes de la comunidad.

### **Perspectivas**

Es necesario continuar con el proceso de validación de la aproximación de GFBM. Para ello deben evaluarse más condiciones ambientales, como nutrientes y temperatura, quienes resultan ser de las más influyentes en la dominancia de especies nocivas (Paerl & Huisman, 2008). Dicha tarea está siendo realizada por quien suscribe, evaluando la sucesión de GFBM bajo cuatro combinaciones de temperatura y carga de nutrientes (Beca de iniciación a la investigación, BE\_INI\_1732, ANII). Otro factor de importancia sería la depredación del fitoplancton por parte del zooplancton, la cual resulta un factor estructurador de esta comunidad (Carpenter *et al.*, 1985). Se espera que el zooplancton influya en la dominancia de GFBM con rasgos que permitan la disminución de pérdidas por depredación (Sommer, *et al.*, 1986), tales como altos valores de MLD y producción de aleloquímicos. Por otra parte sería

relevante evaluar el proceso de invasión por parte de especies como *C. raciborskii* en experimentos con GFBM, considerando estos nuevos factores ambientales.

Además de validar el modelo de GFBM, la información experimental acerca de los aspectos mencionados ayudaría a comprender los efectos del cambio climático y la eutrofización sobre el fitoplancton y el funcionamiento de los sistemas acuáticos subtropicales, principalmente en cuanto a la ocurrencia de floraciones algales nocivas. Por otra parte, utilizar experimentos comunitarios en combinación con modelos matemáticos y datos de la naturaleza, enmarcados en el modelo de GFBM, podría resultar una herramienta directa para monitoreo de los sistemas acuáticos. A su vez, esta permitiría evaluar la susceptibilidad de los mismos al desarrollo de floraciones previo a su utilización o a la realización de cambios en sus cuencas (Nogueira *et al.*, 2010), facilitando así el trabajo de los técnicos. Finalmente, se trataría de una herramienta útil para la creación de estrategias de manejo de los sistemas amenazados por floraciones de cianobacterias potencialmente tóxicas, uno de los principales problemas que afectan a los recursos acuáticos a nivel mundial.

## CONCLUSIONES

- En el transcurso de la sucesión se observó un cambio en los rasgos morfológicos de los organismos. Al inicio de la misma se produjo la dominancia de organismos de bajo MLD, caracterizados por poseer altas tasas de crecimiento (estrategas r, GFBM I). En el estadio intermedio hubo mayor diversidad funcional. En cambio, el estadio final estuvo dominado por organismos de mayor tamaño y rasgos que les confieren mayores ventajas adaptativas bajo las condiciones de esta etapa, cuando la luz es un recurso limitante, como la mayor S/V (estrategas K, GFBM III).
- La dominancia del GFBM III en la etapa final de una sucesión autogénica, bajo condiciones similares a las de un lago somero eutrófico durante el verano, coincide con datos naturales y modelos matemáticos. Este GFBM incluye a cianobacterias formadoras de floraciones potencialmente tóxicas. Se observó la dominancia de distintas especies del GFBM III en los diferentes tratamientos.
- La inoculación de *C. raciborskii* no resultó en la dominancia sino en un estado de coexistencia entre esta especie y la comunidad residente. Las explicaciones posibles a la falta de dominancia pueden basarse en la existencia de diferencias de nicho y de adecuación biológica entre estas últimas, así como en la teoría de neutralidad emergente. Hubo efectos negativos sobre el crecimiento del resto de la comunidad, lo que podría deberse a la producción de sustancias alelopáticas por parte de *C. raciborskii*.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría darle las gracias especialmente a:

Mi familia, ya que es responsable, en gran parte, de que haya llegado hasta esta etapa de mi carrera.

A Andrés, por acompañarme durante el desarrollo de este proyecto.

A Carla Kruk, el haberme aceptado como su estudiante y haber sido, durante todo este tiempo, una orientadora siempre presente e involucrada con mi trabajo.

A Guadalupe Beamud, por ser mi compañera de experimentos y por toda su ayuda con el análisis de datos.

A todos los compañeros de la Sección Limnología, por toda la ayuda brindada y por hacerme sentir parte de este grupo.

A Eliana y Natalia, por su apoyo y amistad durante todos estos años.

A Federica, Nadia, Natalia, Claudia, Sara y Patricia, por haber sido mis amigas y compañeras de estudio a lo largo de la carrera.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arrigo, K. (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* 437, 349-355.
- Aubriot, L., Bonilla, S., Falkner, G. (2011). Adaptive phosphate uptake behavior of phytoplankton to environmental phosphate fluctuations. *FEMS Microbiology Ecology*. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01078.x
- Benincá, E., Huisman, J., Heerklos, R., Jöhnk, K. D., Branco, P., Van Nes, E. H., Scheffer, M., Ellner, S.P. (2008). Chaos in a long-term experiment with a plankton Community. *Nature* 451, 822-826.
- Bouvy, M., Molica, R., De Oliveira, S., Marinho, M., Beker, B. (1999). Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. *Aquatic Microbial Ecology* 20, 285-297.
- Box, G.E.P., Cox, D.R. (1964). An Analysis of Transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 26, 211-252.
- Briand, J-F., Lebourlanger, C., Humbert, J-F. (2004). *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warming? *Journal of Phycology* 40, 231-238.
- Carpenter, S.R., Kitchell, J.F., Hodgson, J.R. (1985). Cascading trophic interactions and lake productivity. *BioScience* 35, 634-639.
- Chorus, I, Bartram, J. (1999). Toxic Cyanobacteria in Water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. Chapman and Hall, London.
- Fabre, A., Carballo, C., Hernández, E., Piriz, P., Bergamino, L., Mello, L., González, S., Pérez, G., León, J.G., Aubriot, L., Bonilla, S., Kruk, C. (2010). El nitrógeno y la relación zona eufótica/zona de mezcla explican la presencia de cianobacterias en pequeños lagos subtropicales, artificiales de Uruguay. *Panamerican Journal of Aquatic Sciences* 5, 112-125.
- Fabre, A. (2011). Flexibilidad fenotípica de la cianobacteria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* en un gradiente lumínico. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
- Figueredo, C. C., Gianni, A., Bird, D. F. (2007). Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion? *Journal of Phycology* 43, 256-265.
- Finkel, Z.V., Beardall, J., Flynn, K., Quigg, A., Rees, A.T., Raven, J.A. (2009). Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research*. doi:10.1093/plankt/fbp098
- García, P., Reboledo, A., Sarthou, F. (2009). Comparación de la composición y abundancia de las comunidades del plancton y macrófitas en dos lagos someros urbanos: Rodó y Canteras. Informe de curso Limnología Básica Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Uruguay, 1-13.
- González, M.A, Parra, O.O., Cifuentes, A.S. (1995). Técnicas de cultivo de microalgas en laboratorio. En: Manual de métodos ficológicos. Alveal, K., Ferrario, M.E.,

- Oliveira, E.C., Sar, E. (editores.) Universidad de Concepción, Concepción, Chile, 220-249.
- Graham, L. E.; Graham, J. M.; Wilcox, L. W. (2009). *Algae*. Second edition. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ.
- Granéli, E., Weberg, M., Salomon, P.S. (2008). Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. *Harmful Algae* 8, 94-102.
- Gross, E.M. (2003). Allelopathy of aquatic autotrophs. *Critical reviews in plant Science* 22, 213-239.
- Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Røberg, K., Skulberg, R., Beck, M., Wiedner, C. (2008). Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae*. doi:10.1016/j.hal.2008.02.010
- Hamilton, P. B., Ley, L. M., Dean S., Pick, F. R. (2005). The occurrence of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in Constance Lake: an exotic cyanoprokaryote new to Canada. *Phycologia* 44, 17–25.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Pollinger, U., Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35, 403–424.
- Huisman, J., Sharples, J., Stroom, J. M., Visser, P. M., Kardinaal, W. E. A., Verspagen, J. M. H., Sommeijer, B. (2004). Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species. *Ecology* 85, 2960-2970.
- Isvánovics, V., Shafik, H. M., Présing, M., Juhos, S. (2000). Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwater Biology* 43, 257– 275.
- Kalff, J. (2002). *Limnology*. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey.
- Kenesi, G., Hesham, M.S., Kovács, A.W., Herodek, S., Présing, M. (2009). Effect of nitrogen forms on growth, cell composition and N<sub>2</sub> fixation of *Cylindrospermopsis raciborskii* in phosphorus limited chemostat cultures. *Hydrobiologia* 623, 191-202.
- Kirk, J. T. O. (1994). *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Kruk, C. (2001). Sucesión fitoplanctónica en un lago hipereutrófico en proceso de restauración. Tesis de Maestría en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Kruk, C., De León, L. (2002) Asociaciones de fitoplancton en lagos y embalses del Uruguay: validación y aplicación a la gestión de sistemas acuáticos. En: *El agua en Iberoamérica: de la Limnología a la Gestión en Sudamérica*. Fernández-Cirelli, A., Chalar, G. (editores). CYTED XVII y CETA, 143-155.
- Kruk, C., Mazzeo, N., Lacerot, G., Reynolds, C. (2002). Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *Journal of Plankton Research* 24, 9, 901-912.

- Kruk, C., Rodríguez-Gallego, L., Quintans, F., Lacerot, G., Scasso, F., Mazzeo, N., Meerhoff, M., Paggi, J. C. (2006). Biodiversidad y calidad de agua de 18 pequeñas lagunas en la costa sureste de Uruguay. En: Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya. Menafrá, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F., Conde, D. (editores). VIDA SILVESTRE URUGUAY, Montevideo, 599-610.
- Kruk, C. (2010). Morphology captures function in phytoplankton. A large-scale analysis of phytoplankton communities in relation to their environment. Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Kruk, C., Huszar, V. L.M., Peeters, E. T. H. M., Bonilla, S., Costa, L., Lürling, M., Reynolds, C. S., Scheffer, M. (2010). A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton temporal replacement. *Freshwater Biology*. doi:10.1111/j.1365-2427.2009.02298.x
- Kruk, C., Peeters, E. T. H. M., Van Nes, E. H., Huszar, V. L. M., Costa, L. S., Scheffer, M. (2011). Phytoplankton community composition can be predicted best in terms of morphological groups. *Limnology and Oceanography* 56, 1. doi:10.4319/lo.2010.56.1.0000.
- Lampert, W. Sommer, U. (2007). *Limnoecology, The Ecology of lakes and streams*. Second edition. Oxford, University press. New York.
- Leflaive, J, Ten-Hage, L. (2007). Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwater Biology* 52, 199–214.
- Litchman, E., Klausmeier, C. A., Schofield, O. M., Falkowski, P. G. (2007). The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. *Ecology Letters* 10, 1170–1181.
- Litchman, E., Klausmeier, C.A. (2008). Trait-Based Community Ecology of Phytoplankton. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39, 615–39.
- Litchman, E. (2010). Invisible invaders: non-pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* 15, 1560-1572.
- Lund, J.W.G., Kipling, C., LeCren, E.D. (1958). The invert microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11, 143-170.
- MacDougall, A.S., Gilbert, B., Levine, J.M. (2009). Plant invasions and the niche. *Journal of Ecology* 97, 609-615.
- Margalef, R. (1978). Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologia Acta* 1, 493-349.
- Mehnert, G., Leunert, F., Cirés, S., Jöhnk, K.D., Rüdiger, J., Nixdorf, B., Wiedner, C. (2010). Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. *Journal of Plankton Research* 32, 1009-1021.
- Nogueira, L., Sarthou, F., Cabrera, C., Carballo, C., Kruk, C. (2010). Cianobacterias y agua potable: efectos de la temperatura y nutrientes en lagunas naturales. En:

Libro de resúmenes XVIII jornadas de jóvenes investigadores Universidad nacional del litoral. Santa Fe, Argentina.

- Pacheco, J. P., Iglesias, C., Meerhoff, M., Fosalba, C., Goyenola, G., Texeira-de Mello, F., García, S., Gelós, M., García-Rodríguez, F. (2010). Phytoplankton community structure in five subtropical shallow lakes with different trophic status (Uruguay): a morphology-based approach. *Hydrobiologia*, 646, 187-197.
- Padisák, J. (1997). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptative cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband. Monographic studies* 107, 563-93.
- Paerl, H.W., Huisman, J. (2008). Blooms like it hot. *Science* 320, 57-58.
- Piccini, C., Aubriot, L., Fabre, A., Amaral, V., González-Piana, M., Figueredo, C.C., Gianni, A., Vidal, L., Kruk, C. (en prensa). Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes.
- Reynolds, C. S. (1984). *The Ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Reynolds, C. S. (1997). Vegetation process in the pelagic: a model for ecosystem theory. En: Kinne, O. (editor), *Excellence in ecology*. Ecology Institute, Oldendorf.
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., Melo, S. (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24, 417-428.
- Rodríguez-Gallego, L., Meerhoff, E., Clemente, J. M., Conde, D. (2010). Can ephemeral proliferations of submerged macrophytes influence zoobenthos and water quality in coastal lagoons? *Hydrobiologia*, 646, 253-269.
- Roy, S., Chattopadhyay, J. (2007). Towards a resolution of The paradox of the plankton: a brief overview of the proposed mechanisms. *Ecological complexity* 4, 26-33.
- Scheffer, M. (1998). *Ecology of Shallow lakes*. Population and Community Biology Series 22. Chapman & Hall. Londres.
- Scheffer, M., Rinaldi, S., Gagnani, A., Mur, L.R., van Nes, E.H. (1997). On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology* 78, 272-282.
- Scheffer, M., van Nes, E.H. (2009). Self-organized similarity, the evolutionary emergence of groups of similar species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 6230-6235.
- Schwaderer, A., Yoshiyama, K., de Tezanos Pinto, P., Swenson, N. G., Klausmeier, C. A., Litchman, E. (2011). Eco-evolutionary differences in light utilization traits and distributions of freshwater phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 56, 589-598.
- Segura, A. M., Kruk, C., Calliari, D., Fort, H. (2010a). Trait-Based approach disentangles core features of phytoplankton succession. En: *Morphology captures function in phytoplankton. A large-scale analysis of phytoplankton communities in relation*

- to their environment. Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 75-91.
- Segura, A.M., Calliari, D., Kruk, C., Conde, D., Bonilla, S., Fort, H. (2010b). Emergent neutrality drives phytoplankton species coexistence. *Proceedings of the royal Society. Biological Sciences*. doi: 10.1098/rspb.2010.2464
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 24, 623-656.
- Sommer, U. (1981). The role of r- and K- selection in the succession of phytoplankton of Lake Constance. *Acta Oecológica* 2, 327-342.
- Sommer, U., Gliwicz, Z. M., Lampert, W. & Duncan, A. L. (1986). The PEG-model of seasonal succession of plankton events in fresh-waters. *Archiv für Hydrobiologie* 106, 433-471.
- Sommer, U. (1991). Convergent Succession of Phytoplankton in Microcosms with Different Inoculum Species Composition. *Oecología* 87, 171-179.
- Sperfeld, E., Schmidtke, A., Gaedke, U., Weithoff, G. (2009). Productivity, herbivory, and species traits rather than diversity influence invasibility of experimental phytoplankton communities. *Oecología*. DOI 10.1007/s00442-010-1594-4.
- Utermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommen der quantitative phytoplankton methodic. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 9, 1-38.
- Vidal, L., Kruk, C. (2008). *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) extends its distribution to Latitude 34°53'S: taxonomical and ecological features in Uruguayan eutrophic lakes. *Panamerican Journal of Aquatic Sciences* 3, 142-151.
- Vidal, L., Kruk, C., Aubriot, L., Piccini, C., Fabre, A., Bonilla, S. (2009). Floraciones de la especie invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* en Uruguay. En: *Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. Sylvia Bonilla (editora). Documento técnico PHI-LAC, N° 16, 79-80.
- Violle, C., Navas, M-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116, 882-892.
- Watson, S. B., McCauley, E., Downing, J. A. (1997). Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnology and Oceanography* 42, 487-495.
- Wiedner, C., Rücker, J., Brüggemann, R., Nixdorf, B. (2007). Climate change affects timing and size of populations of an invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecología* 152, 473-484.
- Wood, S. A., Stirling, D. J. (2003). First identification of the cylindrospermopsin-producing cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborski* in New Zealand. *New Zealand Journal Marine and Freshwater Research* 37, 821-828.