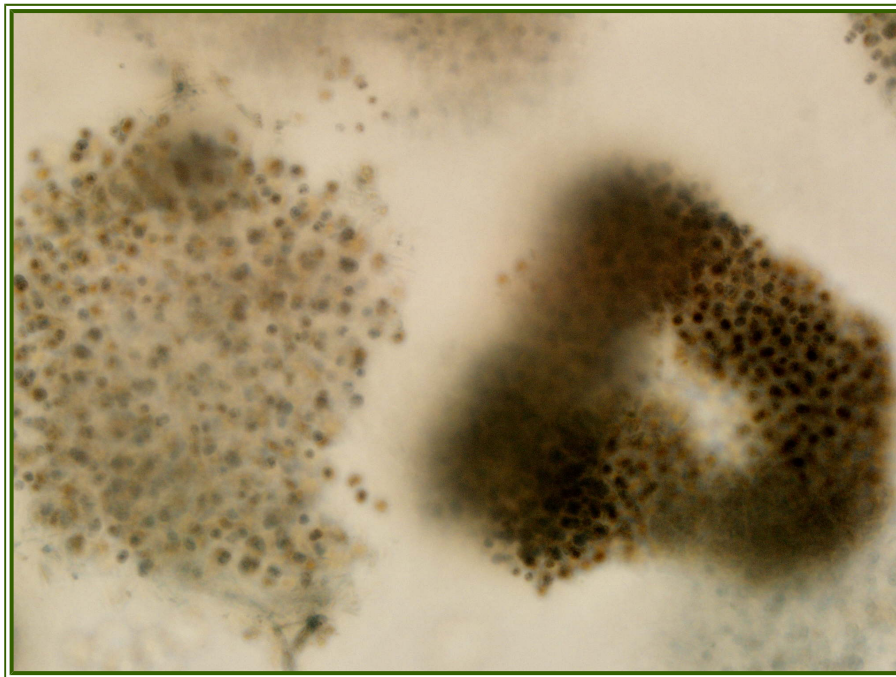




Efectos de la variabilidad ambiental sobre la presencia, estructura comunitaria y floraciones del Complejo *Microcystis aeruginosa*



Ignacio Alcántara Nobile

Laboratorio de Microbiología, IIBCE, MEC
Limnología, IECA, Facultad de Ciencias, UdelaR

Pasantía en Ecología, Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientadores:

Dra Carla Kruk, Dra Claudia Piccini

Montevideo, 2015

Tabla de Contenidos

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Floraciones de Cianobacterias y problemas asociados.....	4
Complejo Microcystis aeruginosa (CMA).....	4
Preferencias ambientales del CMA.....	5
Uruguay y CMA.....	5
Metodologías de muestreo.....	6
Antecedente en el Área de estudio.....	6
Hipótesis y predicciones.....	6
Hipótesis 1.....	7
Hipótesis 2.....	7
Predicción 1.....	7
Predicción 2.....	7
Objetivo.....	7
Objetivos específicos.....	7
Metodología.....	7
Descripción del área de estudio.....	7
Muestreo.....	8
Análisis de muestras.....	9
Análisis de datos.....	10
Resultados.....	10
Estimación de volumen y biovolumen.....	10
Estimación de la profundidad (DimC).....	13
Comparación de métodos de muestreo.....	13
Descripción ambiental.....	15
Variables biológicas.....	15
Relación organismo-ambiente.....	18
Temperatura.....	18
Salinidad.....	18
Turbidez.....	19
Discusión.....	21
Estimación de volumen individual.....	21
Muestreo con red de arrastre.....	21
Morfología.....	21
Biovolumen.....	22
Relación entre el CMA y las condiciones ambientales.....	22
Temperatura.....	22
Salinidad.....	23
Turbidez.....	23
Conclusiones.....	23
Perspectivas.....	24
Agradecimientos.....	24
Referencias.....	24

Resumen

Las cianobacterias experimentan un aumento rápido de su biomasa cuando las condiciones ambientales son favorables, eventos denominados floraciones, sobre todo cuando hay alta temperatura, columna de agua estable y concentraciones elevadas de nutrientes.

El Complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) (Orden: Chroococcales) incluye a una o varias especies morfológica y genéticamente similares. Los organismos que integran el CMA pueden alcanzar grandes tamaños y regulan su posición en la columna de agua por flotación lo que les permite formar acúmulos densos superficiales y favorecerse en condiciones de estratificación.

Con el fin de evaluar la distribución, biovolumen y morfología de CMA frente a la heterogeneidad ambiental impuesta por el sistema Río Uruguay-Río de la Plata se utilizaron muestras tomadas desde Salto Grande hasta Punta del Este en los meses de enero, marzo y junio 2013.

El método convencional (i.e: botella) para la detección y cuantificación de fitoplancton a menudo no logra capturar la presencia de estos organismos cuando están en baja densidad. Sin embargo, su presencia es relevante desde el punto de vista del monitoreo y predicción de floraciones, es por esto que se evaluó un método alternativo de muestreo. Se utilizó una red cónica de 115 μm de malla con el fin de concentrar grandes volúmenes de agua (~7000 L) y de esa manera asegurar la colecta de los organismos de gran tamaño dentro del plancton como es el caso de CMA. A su vez, para los cálculos de biovolumen se ajustó una forma geométrica mas adecuada a las características del objeto de estudio tomando tres dimensiones lineales (largo, ancho y profundidad).

En relación a la metodología evaluada, se encontró que la aplicación de la forma geométrica del elipsoide resultó más precisa para calcular el biovolumen que la esfera y el esferoide prolado, dado que estos últimos sobrestiman entre 5 y 2 veces el volumen estimado por elipsoide. Además, el empleo de la red presentó una efectividad del 43% mayor respecto a la botella en la detección y colecta de colonias de CMA.

Se encontraron colonias de CMA en todos los sitios y en todas la fecha de muestreo, siendo Salto el sitio que presentó las mayores biomásas con valores cercanos a $1,0 \text{ e}+7 \mu\text{m}^3\text{ml}^{-1}$ ($10 \text{ mm}^3\text{L}^{-1}$), Fray Bentos, Carmelo y Colonia presentaron valores intermedios de entre $1,0\text{e}+3$ y $1,0\text{e}+5 \mu\text{m}^3\text{ml}^{-1}$ constantes en los tres meses de trabajo. Montevideo y Punta del Este presentaron valores bajos y variables según la fecha del muestreo.

Se encontraron colonias de CMA en un amplio gradiente de condiciones con salinidad de 0 a 30 y temperatura de 11 a 34. Sin embargo, la presencia de CMA fue significativamente mayor en los sitios con menor salinidad, mayor turbidez y mayor temperatura, aunque esta última no se relacionó de manera significativa. Se observó además, una tendencia al aumento del biovolumen con la temperatura, asociado a una disminución en el volumen individual, dimensión lineal máxima y aumento de la relación superficie/volumen.

Se concluye que aunque la salinidad compromete la supervivencia de estos organismos, no sería una barrera para su dispersión, ya que se encontraron colonias incluso en el límite exterior del estuario del Río de la Plata a salinidades típicamente marinas. En cuanto a la propuesta metodológica, se comprobó que la utilización de la red representa un buen complemento a la botella para el muestreo, especialmente útil para la detección del CMA cuando se encuentra en bajas abundancias.

Introducción

Floraciones de Cianobacterias y problemas asociados

Las cianobacterias son organismos procariotas que realizan fotosíntesis oxigénica. Bajo determinadas condiciones ambientales, las cianobacterias pueden crecer rápidamente, aumentando su biomasa en varios órdenes de magnitud (Reynolds & Walsby, 1975). Estos eventos son denominados comúnmente floraciones. A nivel global las floraciones de cianobacterias han incrementado su frecuencia asociadas a un aumento de la eutrofización (Moss et al., 2011). La eutrofización es un proceso natural que sufren los ecosistemas acuáticos por el aumento de nutrientes que se ha visto drásticamente acelerado como consecuencia de actividades humanas principalmente a través del desarrollo urbano, agrícola e industrial (Paerl et al., 2001; Conde, 2009). El embalsado de ríos, modificación de la vegetación ribereña, y cambios en el patrón de precipitaciones y temperaturas producto del cambio climático, son también escenarios favorables para el aumento de las floraciones (Paerl & Huisman, 2009).

Las floraciones afectan la calidad del agua disminuyendo la transparencia y la concentración de oxígeno, lo cual deriva en efectos negativos para la biodiversidad y el uso del cuerpo de agua por el hombre. Asimismo, muchas especies que forman floraciones son productoras de toxinas (cianotoxinas) (Mazur & Pliński, 2001). Las mismas pueden ser nocivas para la biota acuática y terrestre, incluidos los seres humanos (Paerl et al., 2001). Uno de los tipos más comunes de cianotoxinas son las microcistinas las cuales tienen efectos negativos a nivel hepático que pueden provocar el colapso de la organización tisular, necrosis y hemorragias (Carmichael, 1992; Brena & Bonilla, 2009).

Complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA)

El género *Microcystis* (Orden: Chroococales) se caracteriza por la presencia de células coccoides que miden entre 4,0 y 6,0 μm de diámetro, usualmente presentan vacuolas y están distribuidas homogéneamente en la colonia. Forman colonias esféricas, subsféricas o irregulares en forma de sacos o bolsas, reticulados o clatrados y envueltas por un mucilago amorfo transparente (Komárek & Komárková, 2002; Vidal, 2002).

Microcystis aeruginosa tiene un ciclo de vida anual en condiciones naturales que se cree está regulado por factores ambientales (Reynolds, et al., 1981). El mismo se divide en 4 fases: 1) la fase de hibernación o senescencia en la cual los organismos se encuentran dormantes en el sedimento y ausentes de la columna de agua; 2) la fase inicial, que experimentan cuando ocurren cambios en el ambiente que generan cambios en la actividad fisiológica de los organismos dormantes; 3) la fase de crecimiento exponencial, donde se da una rápida multiplicación celular (de 1 – 2 semanas); 4) la fase estacionaria donde las colonias están presentes en grandes abundancias causando floraciones (hasta varios meses). Este ciclo fue estudiado para poblaciones del Embalse de Salto Grande. Se encontraron diferencias en las proporciones de las fases de crecimiento, presentando una dominancia de la fase de crecimiento exponencial, a excepción del invierno donde las fases dominantes fueron las 1 y 2 (Vidal, 2002).

Son muchas las especies que pertenecen al género *Microcystis* y tienen similar morfología y respuestas ecológicas (Reynolds et al., 2002; Mitulețu et al., 2013). Algunas especies representativas son *M. aeruginosa*, *M. novacekii*, *M. panniformis*, *M. protocystis* (Vidal et al., 2009). La determinación de los organismos a nivel específico muchas veces es difícil, dado que la densidad celular y forma de la colonia puede variar según el estadio del ciclo de vida (Reynolds et al., 1981; Vidal, 2002). Asimismo, organismos de la misma especie pueden presentar diferencias morfológicas, siendo erróneamente clasificadas como especies diferentes las cuales además presentan similitud en su carga genética (Otsuka et al., 1999). Existen también otros géneros que

pueden confundirse con *Microcystis aeruginosa* como es el caso de *Sphaerocavum* sp. y *Radiocystis* sp. (Vidal et al., 2009). El género *Sphaerocavum* incluso se lo puede encontrar en co-dominancia con *Microcystis* (Kruk et al., 2002; Reynolds et al., 2002; Soares et al., 2013). Como consecuencia, no es fácil distinguir entre si a estas especies y se denominaran en conjunto el complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) (Otsuka et al., 2000 ; Komárek & Komárková, 2002; Vidal et al., 2009; Mitulețu et al., 2013).

Preferencias ambientales del CMA

Se ha descrito que la ocurrencia del CMA está asociada a altas concentraciones de nutrientes en el cuerpo de agua, altas temperaturas y columna de agua estable con mezcla vertical débil (Reynolds & Walsby, 1975). Son organismos con estrategias de vida tipo *K*, por lo que se espera que se vean favorecidos en sistemas enriquecidos en nutrientes, profundos y turbios (Reynolds, 2007; Kruk & Segura, 2012). Este grupo se caracteriza por la presencia de mucílago y de aerótopos que facilitan su flotabilidad. El mucílago tiene un papel clave ya que reduce las pérdidas por herbivoría, genera un microambiente favorable para las células al reducir la permeabilidad a ciertos iones (i.e metales) y ayuda a mantener la homeostasis interna cuando las condiciones ambientales son estresantes (Reynolds, 2007; Kruk et al., 2010). Reynolds et al., 2002, las clasifica dentro del grupo **M** al cual pertenece *Microcystis aeruginosa* y sus subespecies y ecotipos. Señala además que organismos de este grupo pueden alcanzar volúmenes individuales elevados y la capacidad de regular la flotación los beneficia en las migraciones diarias cuando hay condiciones de estratificación. De acuerdo con la clasificación de grupos funcionales basados en morfología (GFBM) (Kruk et al., 2010) estos organismos pertenecen al **grupo VII**. Como principales características de este grupo además de los aspectos morfológicos antes mencionados, se destacan su media a baja tasa de crecimiento ($0,48 - 1,39 \text{ d}^{-1}$), baja tasa de sedimentación ($0,0 - 0,52 \text{ m.d}^{-1}$), la capacidad de acumular grandes biomásas superficiales en concentraciones de saturación de nutrientes y la baja vulnerabilidad a la depredación. Se caracterizan además por crecer en número y acumular biomasa en cuerpos de agua con alto tiempo de residencia (Romo et al., 2013).

Algunos autores sugieren que las especies del CMA no prosperan en aguas con alta salinidad (Paerl et al., 2001). Sin embargo, estudios con cepas de *M. aeruginosa* reportan valores máximos de crecimiento a concentraciones de salinidad de hasta 7,0 (Otsuka et al., 1999), 10,0 (Orr et al., 2004) y 14,0 (Verspagen et al., 2006). Experimentos donde las sometían a shock salinos de 15,0 y 17.5 mostraron que, aunque resultaron capaces de crecer y producir toxinas por al menos una semana, sus tasas de crecimiento y producción declinaban (Tonk et al., 2007). En un estudio realizado comparando los GFBM encontraron que las tasas de crecimiento medias del grupo VII eran de $0,5 \text{ d}^{-1}$ a salinidades de entre 0,0 y 12,5 no reportando crecimiento positivo a salinidades mayores (Cabrera Di Piramo et al., 2013).

Uruguay y CMA

Una revisión a nivel nacional donde se analizaron datos de 151 ecosistemas acuáticos de nuestro país (Kruk et al., 2013) determinó que el 70% de los cuerpos de agua son eutróficos y que al menos un 40% de ellos presentan altas biomásas y/o floraciones nocivas de cianobacterias.

En Uruguay las floraciones de cianobacterias son muy frecuentes, particularmente las del género *Microcystis* que se registran en un importante número y diversidad de ambientes (Vidal & Britos, 2012; Kruk et al., 2013) El primer registro de una floración de cianobacterias en Uruguay data del año 1982 (Vidal & Britos, 2012). Desde ese entonces se las ha encontrado tanto en el Río de la Plata como en el Río Uruguay, Embalses de Salto Grande, Palmar, Baygorria y Rincón del Bonete, lagos naturales y artificiales de la costa, así como en muchas de las playas utilizadas para baño y recreación de la mayor parte de la costa del Río de la Plata (Vidal et al., 2009). A partir del

año 1999 se cuenta con el primer registro de una floración conteniendo microcistinas en el Río de la Plata (De León & Yunes, 2001). De acuerdo a la información disponible, son comunes en ambientes con salinidad menor a 5,0 (Sienra & Ferrari, 2006) aunque hay registros de su presencia en ambientes con valores mayores (20,0) como son Piriápolis y Punta del este (Ferrari & Perez, 2002).

Metodologías de muestreo

El estudio de las cianobacterias tóxicas es fundamental para poder gestionar adecuadamente los recursos hídricos. Para ello es necesario seleccionar buenas estrategias de muestreo y metodologías de estimación de sus concentraciones en el agua.

Debido al gran tamaño que pueden alcanzar los organismos del CMA (55 - 2200 μm) y a la relación inversa existente entre la abundancia de organismos y el tamaño corporal (Gaedke, 1992) se espera que aparezcan en bajas abundancias en relación con otros organismos del fitoplancton en los sistemas naturales. Por esta razón, los métodos de muestreo comúnmente utilizados incluyendo las botellas pueden no ser adecuados para detectarlos cuando se encuentran en bajas concentraciones, ya que retienen un volumen de agua pequeño, llevando a una subestimación de su presencia en el ambiente (Rodríguez-Ramos et al., 2014). En este trabajo se propone utilizar mayores volúmenes de agua mediante la utilización de redes cónicas que permitan una mayor concentración de los organismos (Boltoiovsky, 1981).

Una de las mejores aproximaciones a la estimación de la biomasa de fitoplancton y de cianobacterias en particular es el biovolumen (Sun & Liu, 2003; Kruk et al., 2009). Éste se estima mediante la aproximación de los organismos a formas geométricas (Hillebrand et al., 1999). Sin embargo, este método presenta dificultades en el caso del CMA. Debido a su gran tamaño y a la deformación que sufren en las cámaras de sedimentación es poco fiable adjudicarles la forma esférica, sugerida por Hillebrand et al., 1999, ya que sobreestima el biovolumen.

A modo de ejemplo: una colonia que tiene 200 μm de largo, 150 μm de ancho y 50 μm de profundidad. Su volumen calculado como si esta fuera esférica sería de $4,2 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, tendría un volumen de $3,1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ si fuera esferoide prolado y $7,9 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ si fuera elipsoide. Es por ello que se considera necesario estimar por lo menos dos dimensiones o tres, incluyendo ésta última la profundidad, la cual generalmente no es determinada por ser trabajosa de medir.

Antecedente en el Área de estudio

El área de estudio incluyó el sistema integrado por el Río Uruguay (RU) y Río de la Plata (RdIP) los cuales son fundamentales para los habitantes de los países que se encuentran a sus márgenes (Uruguay y Argentina). En los últimos años se registra un aumento de los procesos de eutrofización, indicando la presión antropogénica a la que se encuentra sometida el sistema (Nagy et al., 2002). Se destaca el hecho de que las floraciones son frecuentes y que las variaciones en salinidad, e hidrodinámica son importantes (García & Bonel, 2014; Sathicq et al., 2014). Organismos del CMA han sido reportados en varios trabajos tanto para el embalse de Salto grande (De León & Chalar, 2003; Chalar, 2009; O'Farrell et al., 2012; Boltovskoy et al., 2013) y RU (Ferrari et al., 2011) como para el RdIP (De León & Yunes, 2001; Ferrari & Perez, 2002; Sienra & Ferrari, 2006; Sathicq et al., 2014). La particularidad de estos trabajos es que la colecta de muestras fue realizada con botella en superficie o integrando una porción de la columna de agua y el análisis de organismos fue realizado mediante conteo de células sin estimar biovolumen. En cuanto a la composición específica todos concuerdan de que hay entre 2 y 5 morfotipos distintos de *Microcystis* siendo *M. aeruginosa* la más abundante.

Hipótesis y predicciones

La alta concentración de nutrientes, bajas salinidades y bajo tiempo de residencia favorecen el establecimiento y crecimiento del CMA ya que sus rasgos funcionales los hacen más adecuados frente a estas condiciones respecto a otros grupos de fitoplancton.

En este marco se predice que se encontrarán colonias del CMA en la mayoría de los sitios producto de un sistema enriquecido con nutrientes y con alto grado de impacto antrópico. Los mayores valores de biomasa se observarán en aquellos sitios con alta temperatura y menor salinidad. Se espera una mayor sensibilidad en la detección a bajas concentraciones de biomasa por parte de la utilización de red de arrastre.

Hipótesis 1

Altas temperaturas asociadas a una columna de agua más estable, producto de la estratificación térmica, favorecen el crecimiento y acumulación de biomasa por parte del CMA frente a otros grupos de fitoplancton.

Hipótesis 2

La salinidad afecta negativamente el crecimiento de los organismos del CMA y compromete su sobrevivencia.

Predicción 1

Mayores biomasa y colonias de mayor tamaño se encontrarán en aquellos sitios donde la temperatura sea elevada.

Predicción 2

En los sitios donde las fluctuaciones de salinidad sean relevantes (Montevideo y Punta del Este) las biomasa tenderán a ser muy bajas o nulas y los tamaños de las colonias menores.

Objetivo

Evaluar la distribución, biovolumen y morfología de las colonias del CMA en el sistema Río Uruguay-Río de la Plata (desde Salto a Punta del Este), utilizando una red para concentrar grandes volúmenes de agua, y explorar su relación con las variables ambientales.

Objetivos específicos

1. Comparar distintas aproximaciones geométricas para estimar el biovolumen de colonias CMA y generar un modelo que facilite su aplicación.
2. Relacionar la información generada por el método de red con los resultados obtenidos por métodos clásicos de muestreo con botella.
3. Analizar la distribución en el espacio y en el tiempo (distintas estaciones del año) de variables ambientales medidas *in situ*, tales como: temperatura, salinidad, turbidez.
4. Analizar la distribución en el espacio y en el tiempo (distintas estaciones del año) del biovolumen y la morfología de la colonia (volumen, relación superficie/volumen y dimensión lineal máxima) de los organismos colectados mediante red.
5. Analizar la relación existente entre el biovolumen, la morfología individual y variables ambientales medidas *in situ*.

Metodología

Descripción del área de estudio

El RU es uno de los más importantes de nuestro país, abarcando todo el litoral oeste, es límite natural con Argentina, y actual área de conflicto ambiental internacional. En él se ubica la represa hidroeléctrica de Salto Grande cuyo embalse tiene un área de 224,000 km² y un volumen de 5109 m³. El RdIP es un estuario turbio y somero con una profundidad media de 10 m. Drena una cuenca de unos 35.000 km² hacia el océano Atlántico, siendo la segunda en extensión de América del Sur (Guerrero et al., 1997). Sus tributarios más importantes son los ríos Paraná y Uruguay, que aportan en promedio un caudal de 25.000 m³s⁻¹ en su desembocadura (Nagy et al., 1987). El RdIP se caracteriza por presentar un gradiente salino debido a la mezcla de aguas de origen continental con aguas de origen marino. Como resultado, se desarrolla un frente de turbidez en el que confluyen aguas dulces y turbias (eutróficas) con aguas claras y oligotróficas, las cuales generan condiciones lumínicas favorables para la producción primaria (Calliari et al., 2005, 2009).

Muestreo

Se realizaron tres campañas de muestreo en los meses de Enero, Marzo y Junio durante el año 2013 a lo largo del RU desde el embalse de Salto Grande hasta Punta del Este en el RdIP (Tabla I). Se tomaron 6 puntos de colecta incluyendo: embalse de la Represa de Salto Grande, Fray Bentos, Colonia, Carmelo, Montevideo y Punta del Este. En cada punto se tomaron dos estaciones, una de costa (CO) y una de aguas abiertas (AA), en la zona del RU, AA correspondía a la zona media del canal y en el RdIP a una distancia de entre 5 y 7 millas náuticas perpendicular a la costa. En el embalse de Salto Grande, AA corresponde al afluente del lado Argentino, Gualeguaycito y CO al afluente del lado Uruguayo, Itapebí (Tabla 1; Figura 1).

En cada estación se midió la profundidad con ecosonda de la embarcación y se realizó un perfil de luz en profundidad para estimar el coeficiente de atenuación de la luz (KD, m⁻¹). Se tomaron medidas en superficie y fondo de temperatura (T, °C); conductividad (mScm⁻¹), turbidez (NTU) y salinidad.

En cada una de las estaciones se registró la presencia o no de floraciones a simple vista en el agua como manchas verdes. Se tomaron muestras de agua superficial con botella para los análisis de biovolumen de la comunidad fitoplanctónica, las muestras fueron fijadas con solución lugol.

Para la colecta de colonias, se realizó un arrastre con red cónica de 115 µm de malla y una boca de 50 cm de diámetro. Los arrastres tuvieron una duración de aproximadamente 2 minutos y el volumen filtrado se calculó utilizando un flujómetro alcanzando en promedio 7000 litros de agua filtrada. Las muestras fueron fijadas con formol al 4%. En estas muestras se registró la presencia de CMA a simple vista y además se realizaron los análisis de biovolumen al microscopio óptico.

Tabla I. Características de los sitios de muestreo. AA: aguas abiertas. CO: costa RU: rio Uruguay, RdIP: Rio de la Plata.

Localidad	Estación	Sitio de referencia	Latitud	Longitud	Distancia Costa (km)
Salto (RU)	AA	Brazo Gualeguaicito	31° 12'	57° 59'	3,7
Salto (RU)	CO	Brazo Itapebi	31° 11'	57°52'	0,0
Fray Bentos (RU)	AA	FrenteItapebíCañas	33° 10'	58° 23'	2,4
Fray Bentos (RU)	CO	Al S de la PNN	33° 10'	58° 21'	0,0
Carmelo (RdIP)	AA	Frente a Carmelo, Veril de canal	34°00'	58°22'	5,8
Carmelo (RdIP)	CO	Entre Punta Piedras y muelle	34°00'	58° 17'	0,0
Colonia (RdIP)	AA	Canal del medio NW de isla San Gabriel	34°28'	57° 55'	5,9
Colonia (RdIP)	CO	Ensenada de la Colonia	34°27'	57°51'	0,0
Montevideo (RdIP)	AA	Al SE de Buen Viaje	34°58'	56°05'	7,7
Montevideo (RdIP)	CO	Playa Pocitos	34°55'	56°08'	0,0
Punta del Este (RdIP)	AA	W de Punta Britos Isla Gorriti	34°57'	55° 02'	6,4
Punta del Este (RdIP)	CO	Playa Mansa	34°55'	54° 58'	0,0

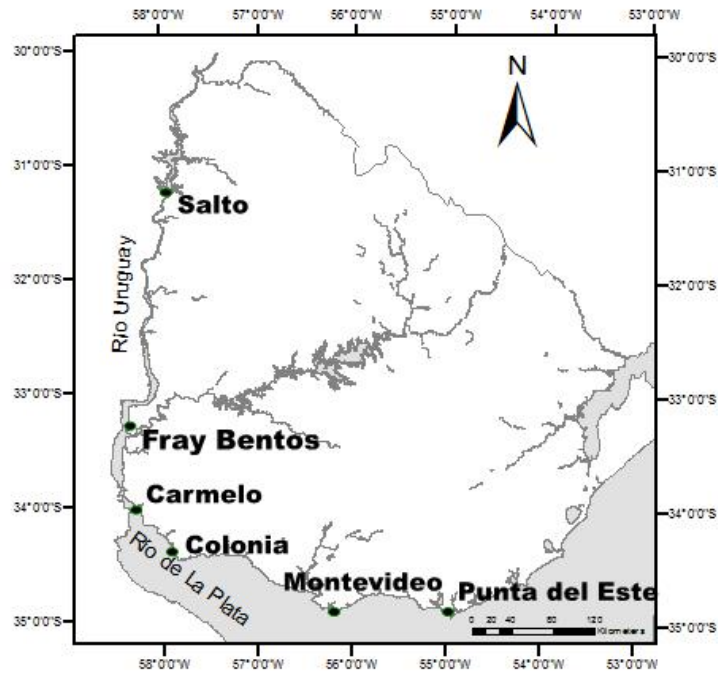


Figura 1. Mapa del sistema de estudio, identificando los sitios de muestreo.

Análisis de muestras

Las colonias del CMA tanto de Botella como de Red fueron contabilizados y medidos en microscopio invertido Olympus IX81 con una cámara CCD de alta velocidad marca Olympus DP71 utilizando el software Cell F para procesar las fotografías.

El conteo de las muestras de red se realizó en cámaras Sedwick-Rafter de 1 mL. Se evaluaron bandas y se contaron un máximo de 100 colonias de CMA por muestra o hasta analizar cuatro cámaras completas cuando la abundancia no alcanzaba las 100 colonias. 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 aumento utilizado fue de 1000X.

Las medidas de los organismos fueron realizadas durante el conteo y para todos los organismos observados. Se registraron las dimensiones correspondientes al largo (DimA), ancho (DimB) y profundidad (DimC) las cuales fueron tomadas con el software y con ellas se realizaron los cálculos volumen (μm^3) y superficie (μm^2) de las colonias (Hillebrand et al., 1999). Se calculó el volumen utilizando las formas de esfera, esferoide prolado y elipsoide. Además se considero la dimensión lineal máxima (MLD, μm) y la relación superficie/volumen ($\text{s/v}, \mu\text{m}^{-1}$) como rasgos de la morfología individual de la colonia. El biovolumen ($\mu\text{m}^3\text{L}^{-1}$) se calculó multiplicando el volumen individual por su abundancia en el agua. En los casos en los que fue posible distinguir el mucilago de las células éste quedo por fuera de las medidas, cuando no fue posible distinguirlo se tomó como referencia los grupos de células dentro de la colonia. La medida en profundidad se realizó ajustando la distancia del objetivo (10X) del microscopio desde la primer célula visible hasta la última célula visible, siendo ésta distancia recorrida registrada por el software.

Se utilizó un código en R para la realización de los cálculos y la individualización de las medidas tomadas por el software de la cámara en el microscopio.

Análisis de datos

Para evaluar las relaciones entre las dimensiones largo (DimA), ancho (DimB) y profundidad (DimC) medidas al microscopio y generar un modelo que permita estimar (predecir) DimC a partir de DimA y DimB, se analizó la distribución de las variables y se evaluó la normalidad mediante la prueba de Shapiro Wilk. Como éstas no presentaron una distribución normal se procedió a trabajar con las variables transformadas mediante el logaritmo en base 10, transformación que resultó en valores que se distribuyeron de acuerdo a la normal. Luego se estudiaron las relaciones lineales existentes entre las dimensiones mediante modelos lineales simples y múltiples. Para seleccionar los modelos se utilizó el criterio de Akaike (AIC), el cual define al mejor modelo como aquel cuyo valor de AIC sea el menor. Para poder comparar entre modelos se utilizó el ΔAIC definido por la ecuación 1. siendo AIC_i el valor de AIC para el modelo i , y AIC_{min} el valor de AIC mas pequeño. Modelos con valores de ΔAIC menores de 2 se consideran similares (Burnham & Anderson, 2002).

$$\Delta i = AIC_i - AIC_{min} \quad (1)$$

El modelo seleccionado fue además validado dividiendo la matriz de datos original en 1/3 y 2/3, utilizando los 2/3 para para generar el modelo y el 1/3 restante para predecir el valor de la variable de respuesta (DimC). El valor obtenido se graficó contra el valor real para ver la precisión del modelo.

Se evaluaron las relaciones entre la presencia de CMA, su morfología y biovolumen con las tres variables ambientales consideradas más relevantes: temperatura, turbidez y salinidad. Los análisis incluyeron comparaciones no paramétricas (Kruskal Wallis) evaluando las diferencias entre las variables continuas ambientales y la variable categórica presencia-ausencia del CMA. Luego el biovolumen, volumen individual, MLD y relación superficie/volumen se graficaron en función de las variables ambientales. Todos los análisis estadísticos y los gráficos fueron realizados en el programa de código libre R versión 3.0.1(R Core Team, 2013).

Resultados

Estimación de volumen y biovolumen

La estimación del volumen individual utilizando la aproximación de la esfera y del esferoide prolado (EsP) alcanzaron valores mayores a los obtenidos utilizando la forma del Elipsoide (Elip) (Figura 2.A y B). Esta diferencia aumenta a valores de volúmenes mayores.

Analizando la relación de las estimaciones Volumen EsP/Volumen Elip se observó que la mayoría de los datos resultan entre 0,5 (50%) y 1,5 (150%) veces mayores, con una cola de la distribución que alcanzó valores que llegaron a ser hasta 8 veces superiores (Figura 2.C). Esta relación aumenta con el tamaño de las colonias (Figura 3.D). Por encima de MLD de 200 μm las diferencias se hacen más notorias pudiendo llegar a ser de entre 6 y 8 veces más (Figura 3.D).

Se utilizaron las dos aproximaciones de volumen individual para estimar el biovolumen ($\mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$) por sitio. Se observó un patrón similar donde el uso de EsP sobrestima entre 1,5 y 3 veces el uso del Elip (Figura 3.B y 3.C) observándose valores especialmente grandes para organismos de mayor tamaño (Figura 3.A).

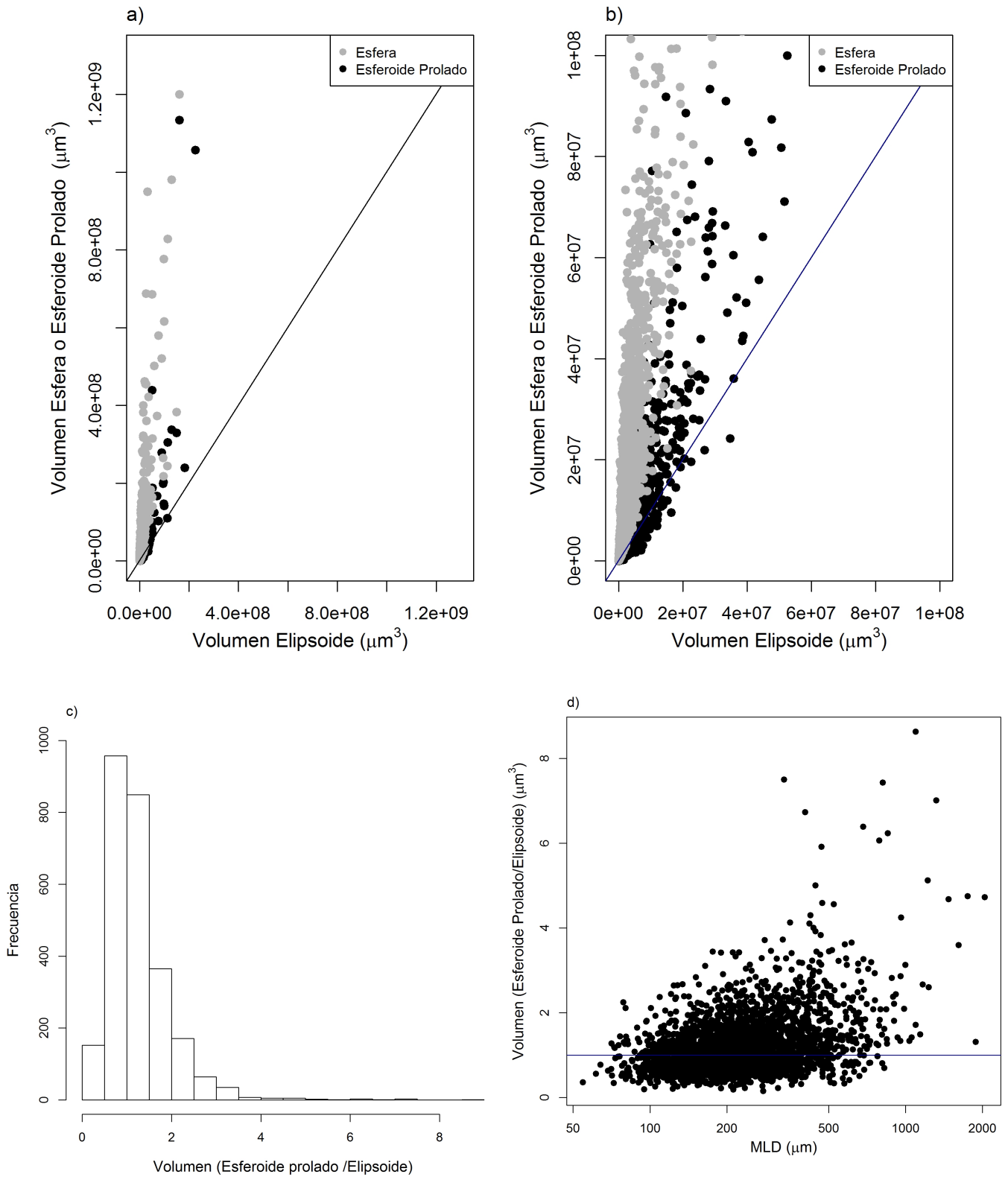


Figura 2. A y B) Comparación entre volumen individual calculado con la aproximación geométrica de esfera (1 dimensión), esferoide prolado (2 dimensiones) y de elipsoide (3 dimensiones). La figura A incluye la totalidad de los datos mientras que la B no incluye los datos extremos. La línea en ambos casos es la recta 1:1. C) Histograma de la relación entre el volumen calculado usando la aproximación de esferoide prolado sobre la aproximación de elipsoide. D) Relación esferoide prolado sobre elipsoide en función de la dimensión lineal máxima (MLD). La recta horizontal representa el 1 y sería el caso en que el volumen calculado por ambas dimensiones coincidiera.

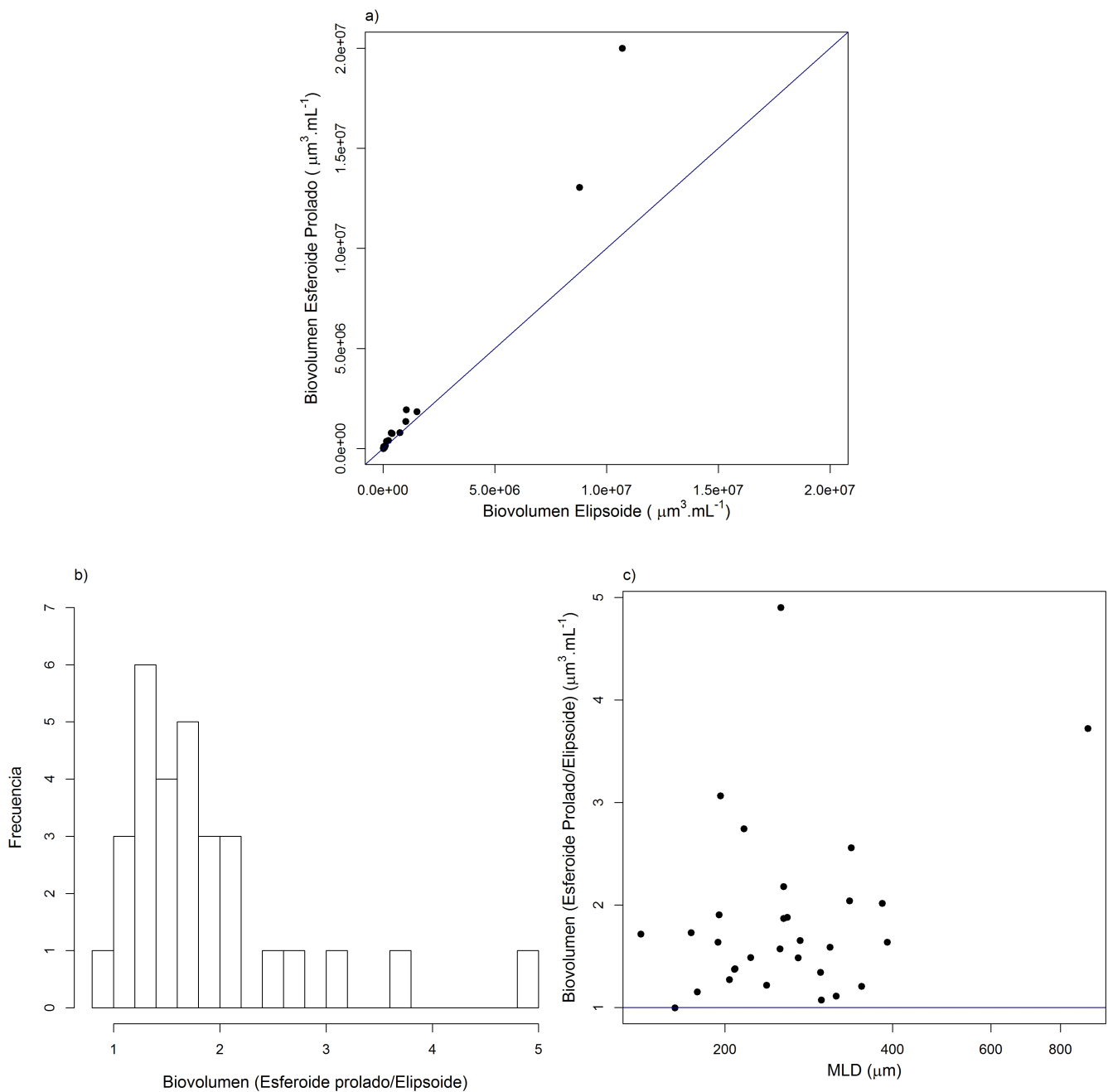


Figura 3. A) Comparación del biovolumen encontrado en cada sitio calculado como un esferoide prolado (2 dimensiones) y como elipsoide (3 dimensiones). La línea corresponde a la recta $x=y$. B) Histograma de frecuencias de la resultante de división entre el Biovolumen calculado por el esferoide prolado sobre el elipsoide. C) Relación esferoide prolado/elipsoide en función de la dimensión máxima lineal (MLD). La recta horizontal representa el 1 y sería el caso en que el biovolumen calculado por ambas dimensiones es igual.

Estimación de la profundidad (*DimC*)

Se realizaron varios modelos lineales para predecir la *DimC* a partir de *DimA* y *DimB*. La regresión lineal múltiple incluyendo *DimA* y *DimB* fue la que resultó con el menor valor de AIC y

fue seleccionada como el mejor modelo (Tabla II).

En la validación realizada para el modelo lineal múltiple, utilizando 1/3 de los valores de la DimC reales en función de los valores de la DimC estimados por el modelo, se observó una alta dispersión en los datos (Figura 4).

Tabla II. Modelos desarrollados para estimar C a partir de A y B, incluyendo variables, parámetros, significancia y valores de AIC.

Modelo	Variables	R ²	Intercepto	Coefficiente	P valor	AIC	ΔAIC
Lineal	DimC vs DimA	0,30	0,97	0,44	<0,001	-2457,9	15
Lineal	DimC vs DimB	0,22	1,26	0,36	<0,001	-2155,2	317,7
Lineal Multiple	DimC vs DimA + DimB	0,31	0,95	0,08 + 0,37	<0,001	-2472,9	0

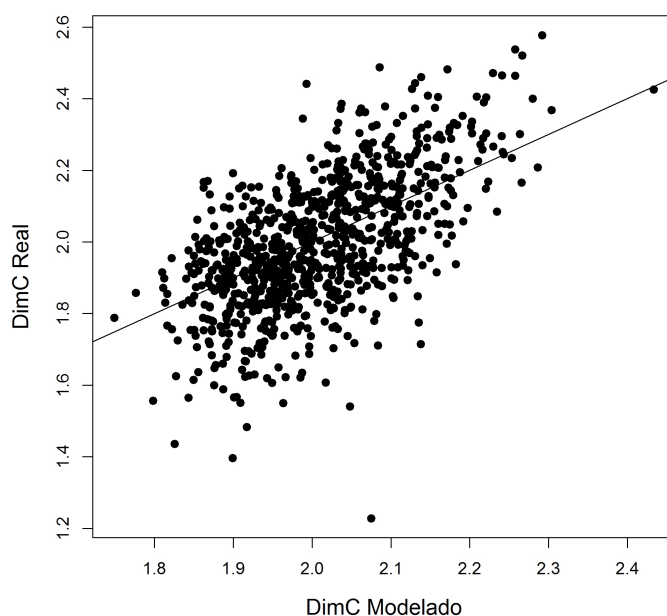


Figura 4. Valores de la DimC estimados por el modelo en función de los valores de la DimC medidos. Ambas variables están transformadas por el logaritmo en base 10. La línea es la recta $x=y$.

Comparación de métodos de muestreo

De las 36 muestras la red detectó presencia de CMA en 30 casos, mientras que la botella lo hizo en 13. Por tanto, en 17 ocasiones la botella no detectó CMA y la red sí lo hizo (47%).

En la comparación del biovolumen de los organismos estimado por ambos métodos se observó que la diferencia fue a bajos valores de biovolumen, mientras que cuando los valores de biovolumen fueron altos las estimaciones por ambos métodos dieron resultados similares (Figura 5). El rango de tamaños que fueron captados por la red fue de $7,4 \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$ hasta al menos $1,1 \text{e}+7 \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$, mientras que el de la botella es de $13270 \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$ hasta al menos $2,2 \text{e}+9$.

Cuando los valores de biovolumen fueron bajos, menores a $1.000 \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$ ($1,0\text{e}-3 \text{mm}^3\text{L}^{-1}$) la

red detectó organismos de manera más efectiva que la botella. A mayores valores de biovolumen (mayor a $1,0e+5 \text{ } \mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}$ $\sim 0,1 \text{ mm}^3\text{L}^{-1}$) ambos métodos detectaron los organismos de manera similar y para los casos más extremos (mayor a $1,0e+7 \text{ } \mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}$ $\sim 10 \text{ mm}^3\text{L}^{-1}$) la botella registró valores mayores de biomasa que la red. Finalmente, a valores intermedios, entre $1,0e+3$ y $1,0e+6 \text{ } \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$ el muestreo con botella puede o no detectar la presencia de colonias mientras que la red los registró siempre.

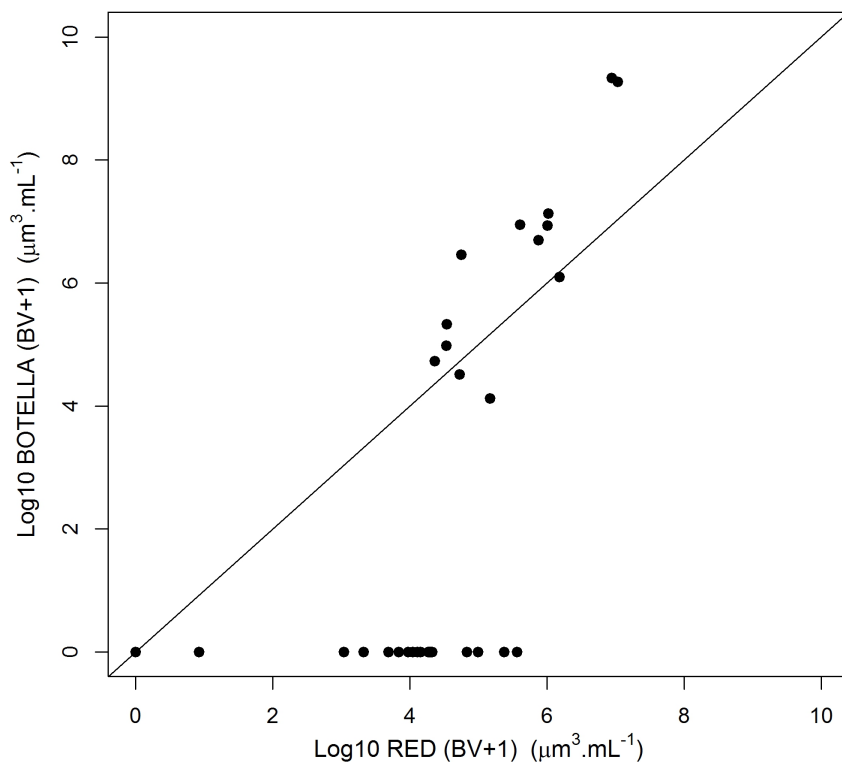


Figura 5. Comparación entre el biovolumen ($\mu\text{m}^3.\text{mL}^{-1}$) de CMA medidos por los métodos de red y botella en cada uno de los puntos de muestreo. La línea y es la recta $x=y$.

Descripción ambiental

La profundidad varió entre 4 y 16 m para los sitios AA y entre 2 y 15 m para los sitios CO. La temperatura mostró un patrón acorde a la estacionalidad registrándose mayores temperaturas en enero (25 – 34 °C), temperaturas medias en marzo (~20°C), y menores para junio (11 – 15°C). La temperatura además mostró un patrón espacial en cada fecha siendo mayor en Salto y disminuyendo a lo largo del eje espacial hasta Punta del Este (Figura 6.A). La salinidad fue de 0 en todos los sitios riparios presentando valores distintos de 0 en las estaciones de Montevideo y Punta del Este. Montevideo fue el sitio que presentó una mayor variación, con valores cercanos a 30 en Enero, 2,5 en marzo y valores intermedios en junio (10 CO, 15 AA). Punta del Este presentó valores más estables y cercanos a 20 en las tres fechas de muestreo (Figura 6.B). La conductividad mostró un patrón asociado a la salinidad, con valores máximos de 46 mS/cm y mínimos de 0,013 mS/cm, repitiendo las características encontradas para la salinidad. La turbidez fue mayor en las estaciones medias (Carmelo y Colonia) donde se alcanzaron valores promedio de 50 NTU. Se destaca el mes de marzo con mayor turbidez alcanzando valores de entre 120 y 140 NTU en Carmelo y Colonia. Los valores menores se dieron tanto en los sitios de Salto y Fray Bentos como en Punta del Este donde no se registró valores mayores a 20 NTU (Figura 6.C). El k_d mantuvo un patrón asociado a la turbidez. Los valores máximos de k_d fueron en las estaciones de Carmelo y Colonia específicamente en el mes de marzo. Salto y Fray Bentos presentaron valores (2 – 4 m^{-1}) un poco por encima de Montevideo y Punta del Este (0 – 2 m^{-1}).

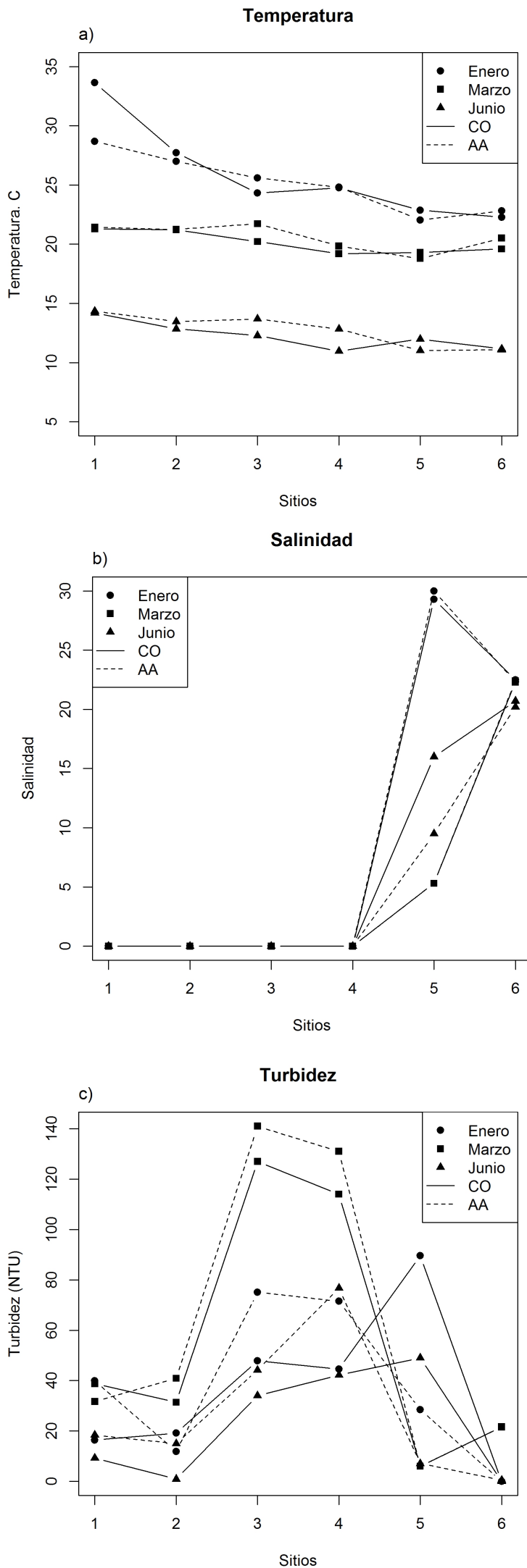
Variables biológicas

Se observaron floraciones a simple vista en el embalse de Salto Grande, inclusive en el muestreo realizado en invierno (junio). El CMA se detectó en todos los meses de muestreo. El único sitio en el que no se registró presencia fue la estación de Punta del Este AA, el resto de las estaciones estuarinas presentaron CMA en por lo menos 2 de los 3 meses. En cuanto al biovolumen de CMA, Salto fue el sitio que mantuvo siempre valores altos $1,0e+6 - 1,0e+7 \mu m^3 mL^{-1}$. Las estaciones intermedias del sistema (Fray Bentos, Carmelo, Colonia) presentaron valores intermedios ($1,0e+3$ y $4,0e+5 \mu m^3 mL^{-1}$) sostenidos para los tres muestreos. Se destaca la particularidad de que Fray Bentos presenta menor variabilidad con sus valores en el orden de $1,0e+4 \mu m^3 mL^{-1}$. Los sitios que presentaron mayor variabilidad en las biomásas registradas fueron Montevideo y Punta del Este con valores desde 0,0 a $1,5e+4$ y $2,0e+3 \mu m^3 mL^{-1}$ respectivamente para cada sitio (Figura 7).

La distribución de frecuencias del volumen individual transformadas por el logaritmo en base 10, no se ajustó a una curva normal pero fue unimodal. La dispersión en los datos fue bastante grande con diferencias en órdenes de magnitud que fueron desde $1,0e+4 \mu m^3$ a $1,0e+8 \mu m^3$. No se observaron diferencias en las medianas ya que todos los sitios presentaron su rango intercuartil entre $1,0e+5$ y $1,0e+6 \mu m$. Solo Montevideo CO en enero se observaron diferencias en la morfología del CMA siendo la mediana del volumen un orden de magnitud mayor (~ $1,0e+7$; Figura 8).

Los patrones observados para el MLD fueron muy similares, con valores mínimos de 70 μm y máximos de 2000 μm . Tampoco se encontraron diferencias entre sitios ni entre los meses, exceptuando el caso de Montevideo CO en enero en el cual se encontraron tamaños sustancialmente mayores (~800 μm) al resto de las medianas para los otros sitios (150~200 μm). Respecto a la relación s/v presentó un patrón muy similar a las otras variables con valores mínimos de $0,01 \mu m^{-1}$ y máximos de $0,2 \mu m^{-1}$. No se observan diferencias entre sitios ni entre los meses, con la excepción nuevamente de Montevideo CO en enero la cuál presenta valores medios de $0,02 \mu m^{-1}$ y su valor máximo no excede los $0,05 \mu m^{-1}$.

Figura 6 A) Temperatura del agua (°C); B) Salinidad; C) Turbidez (NTU). Los sitios, representados con números, están en orden espacial Siendo Salto el 1, Fray Bentos el 2, Carmelo el 3, Colonia el 4, Montevideo el 5 y Punta del Este el 6. AA: Aguas Abiertas, CO: Costa.



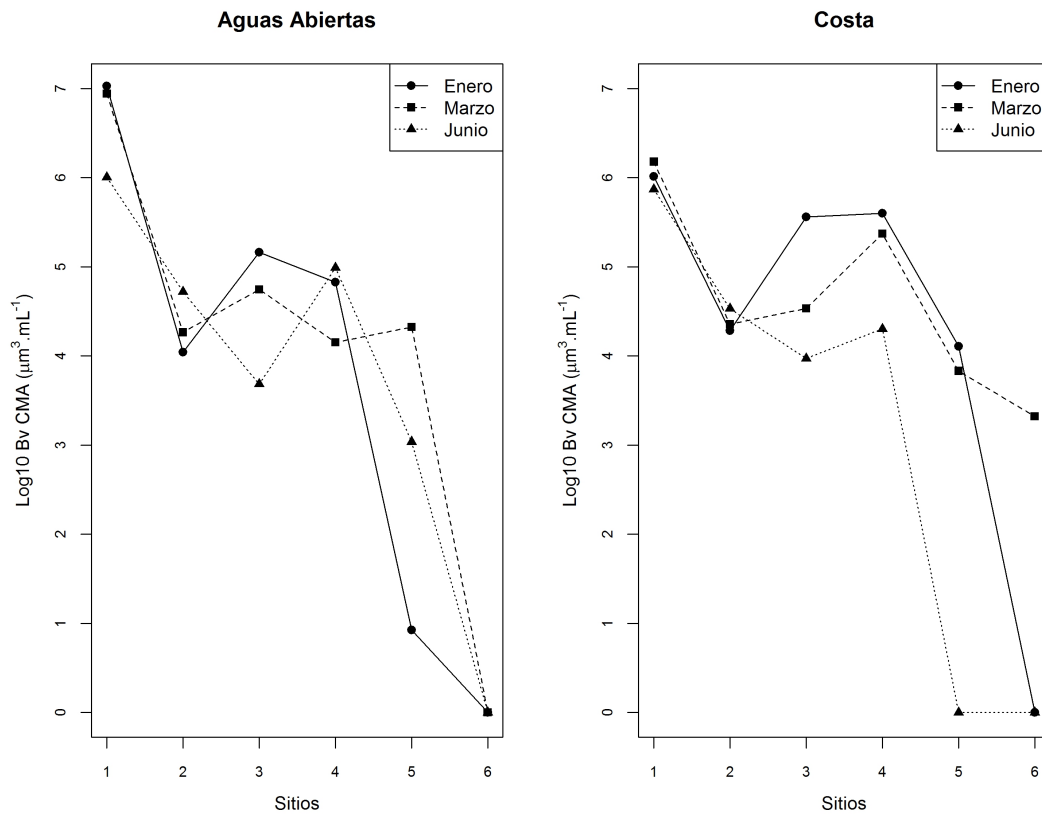


Figura 7. Biovolumen complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA). Los sitios, representados con números, están en orden espacial Siendo Salto el 1, Fray Bentos el 2, Carmelo el 3, Colonia el 4, Montevideo el 5 y Punta del Este el 6.

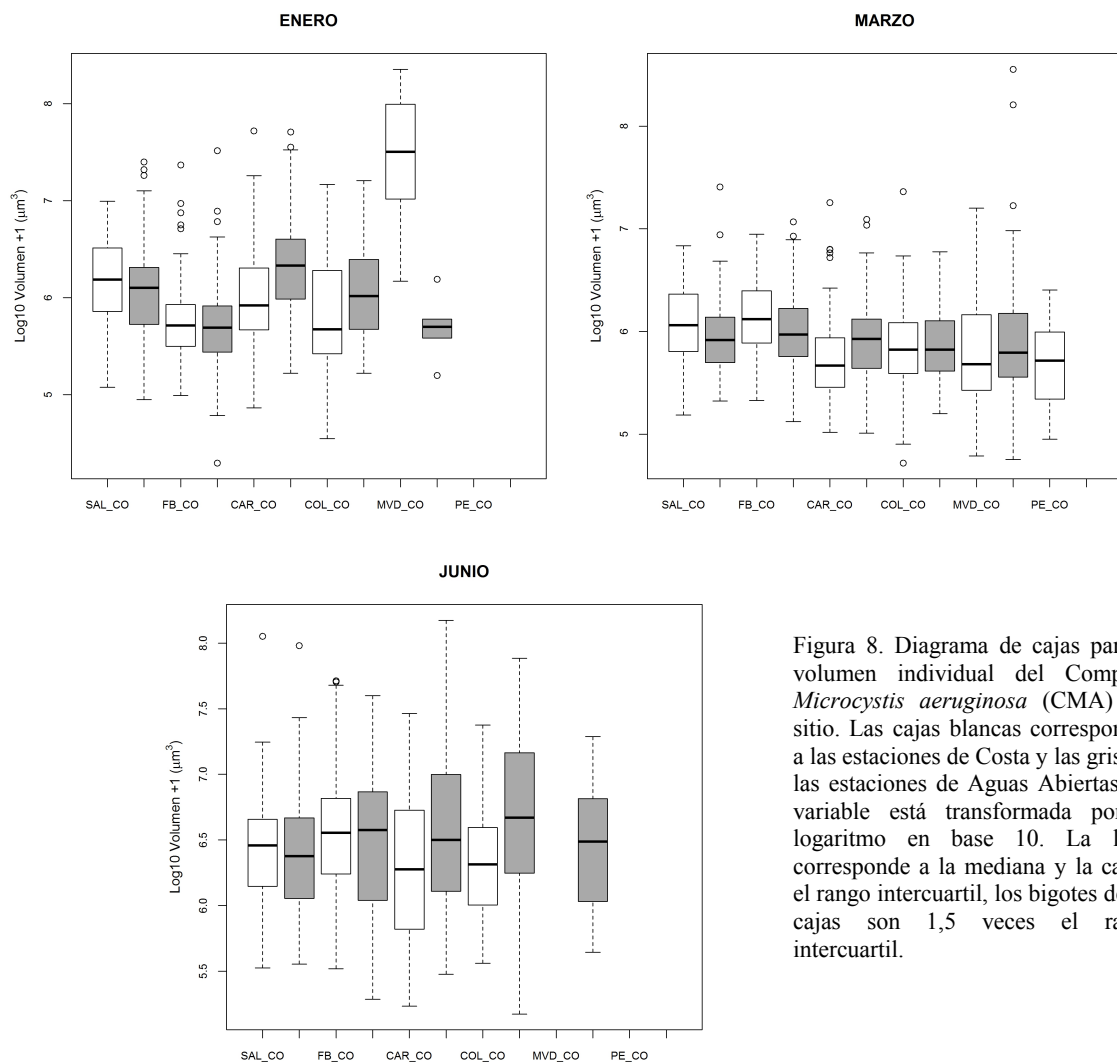


Figura 8. Diagrama de cajas para el volumen individual del Complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA) por sitio. Las cajas blancas corresponden a las estaciones de Costa y las grises a las estaciones de Aguas Abiertas. La variable está transformada por el logaritmo en base 10. La línea corresponde a la mediana y la caja a el rango intercuartil, los bigotes de las cajas son 1,5 veces el rango intercuartil.

Relación organismo-ambiente

Temperatura

No se observaron diferencias significativas respecto a la presencia o ausencia de CMA con la temperatura (Kruskal Wallis, p valor >0,2; Figura 9.A) y se registra CMA en un amplio rango de temperaturas (11 – 31 °C). Sin embargo, se observó una tendencia al aumento del biovolumen con mayores temperaturas (Figura 8.B), conjuntamente con una disminución del volumen individual y MLD (Figura 9.C y D). La relación s/v fue mayor a temperaturas más altas (Figura 9.E) en concordancia con lo encontrado para el volumen y el MLD.

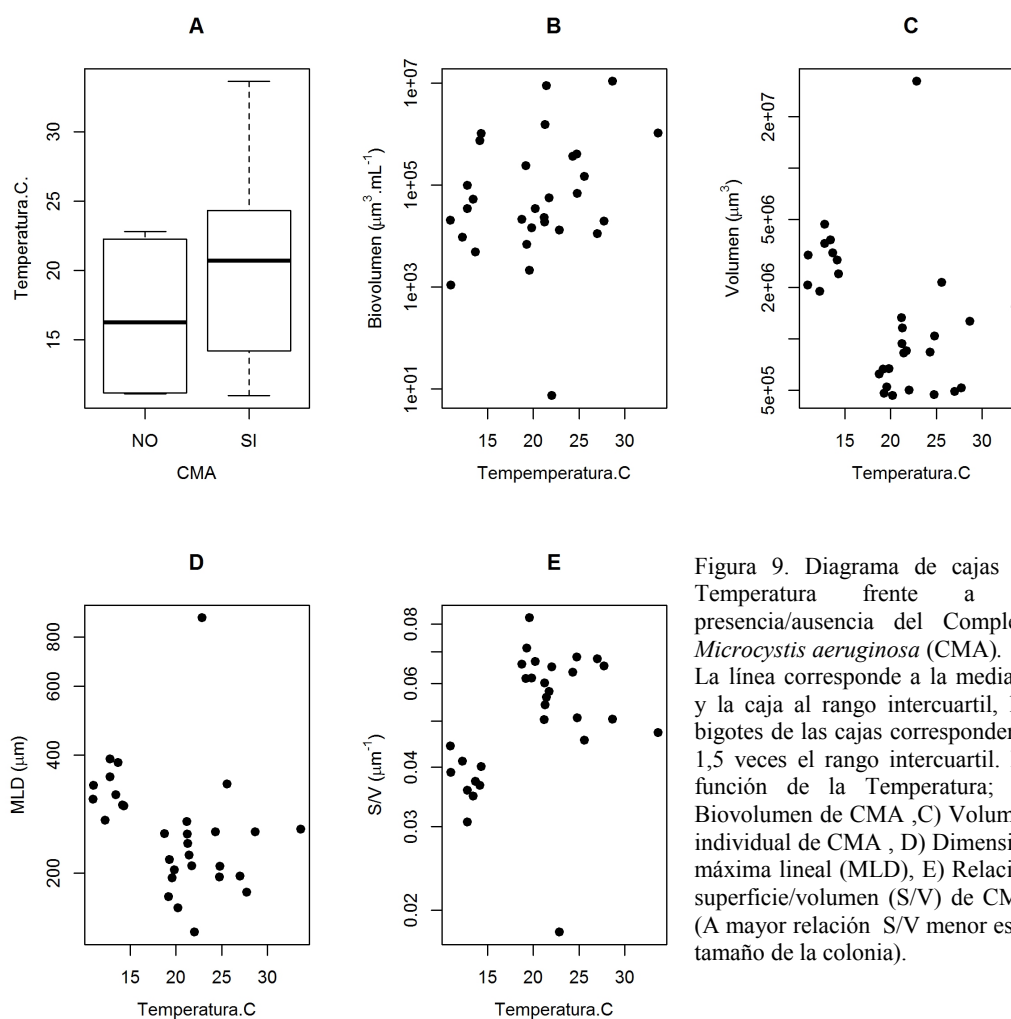


Figura 9. Diagrama de cajas de Temperatura frente a la presencia/ausencia del Complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA). La línea corresponde a la mediana y la caja al rango intercuartil, los bigotes de las cajas corresponden a 1,5 veces el rango intercuartil. En función de la Temperatura; B) Biovolumen de CMA ,C) Volumen individual de CMA , D) Dimensión máxima lineal (MLD), E) Relación superficie/volumen (S/V) de CMA (A mayor relación S/V menor es el tamaño de la colonia).

Salinidad

En cuanto a la salinidad, el CMA presentó diferencias significativas en su presencia-ausencia (Kruskal Wallis, p valor < 0,001; Figura 10.A). En solo 6 casos se encontraron colonias de CMA con valores de salinidad mayores a 0,0, y en la mitad de éstos las salinidades fueron menores a 10.

Los menores valores de biovolumen (< 1,0e+4 µm³.mL⁻¹) se registraron en aquellos sitios cuya salinidad fue mayor a 7 (Figura 10.B). El volumen presentó preferentemente valores bajos a elevadas salinidades, aunque hay un sitio a salinidad de 30 que presenta máximo valor de volumen registrado (3,2e+7 µm³) (figura 10.C). Respecto al MLD no se observó relación con la salinidad, dado que en general los valores menores de esta variable se registraron a salinidad de 0 pero el mínimo valor (141,5 µm) y el máximo valor (895,5 µm) se encontraron a salinidades de 30. La relación superficie/volumen también se comportó acorde a los otros estimadores de tamaño,

presentándose una alta relación s/v, y por lo tanto un tamaño menor en los sitios salinos (Figura 10.E).

Turbidez

En relación a esta variable se observó que la presencia de CMA estuvo significativamente asociada a valores altos de turbidez (Kruskal Wallis, p valor >0,02; figura 11.A). La relación con las variables continuas no fue clara. Se observó una tendencia a registrar mayores valores en el biovolumen frente a valores de turbidez menores a 60 NTU, aunque en un amplio rango de distribución ($1,0e+1 - 1,0e+7 \text{ } \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$; Figura 11.B). Por arriba de 60 NTU también se registran casos pero con menor frecuencia (10) y con valores de entre $1,0e+4$ y $1,0e+5 \text{ } \mu\text{m}^3 \cdot \text{mL}^{-1}$. Respecto a la morfología los patrones son menos claros aún y no permiten establecer ninguna relación (Figura 11.C, D y E).

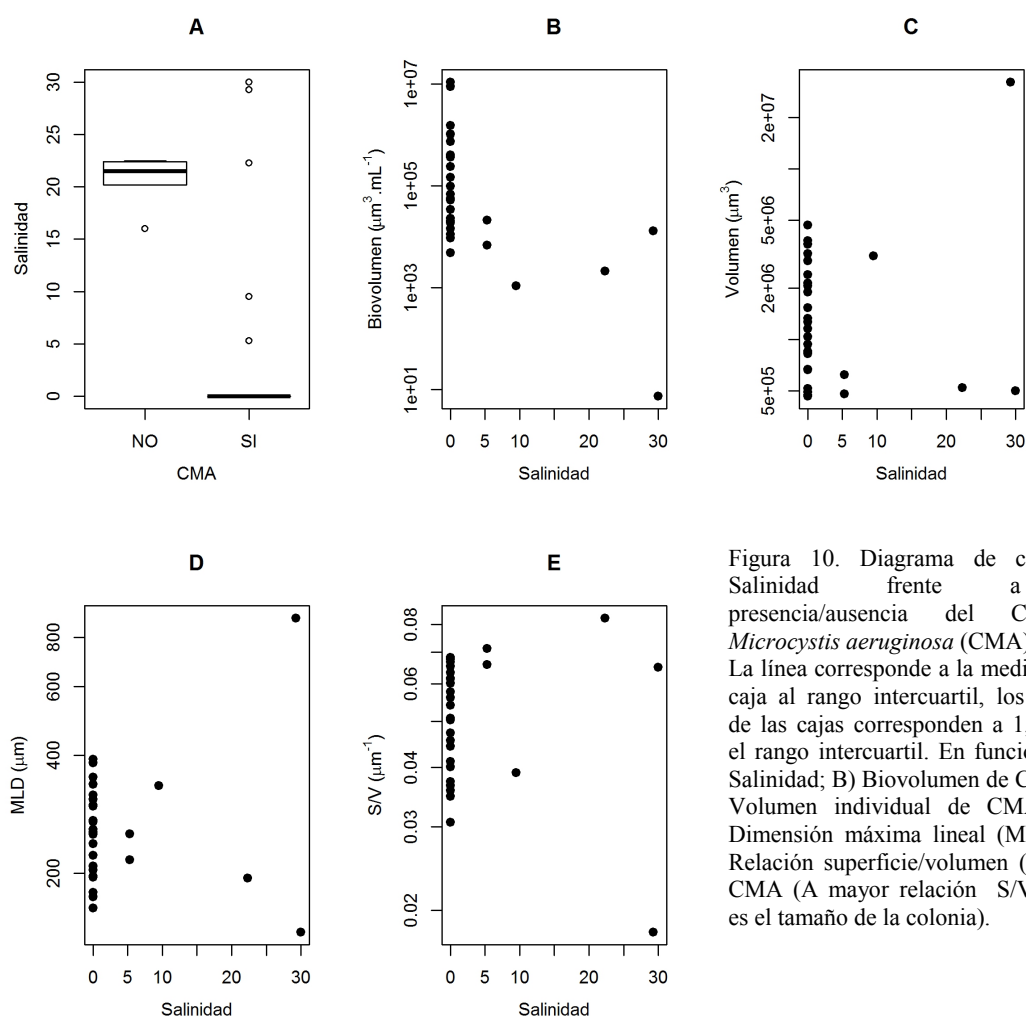


Figura 10. Diagrama de cajas de Salinidad frente a la presencia/ausencia del Complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA). La línea corresponde a la mediana y la caja al rango intercuartil, los bigotes de las cajas corresponden a 1,5 veces el rango intercuartil. En función de la Salinidad; B) Biovolumen de CMA, C) Volumen individual de CMA, D) Dimensión máxima lineal (MLD), E) Relación superficie/volumen (S/V) de CMA (A mayor relación S/V menor es el tamaño de la colonia).

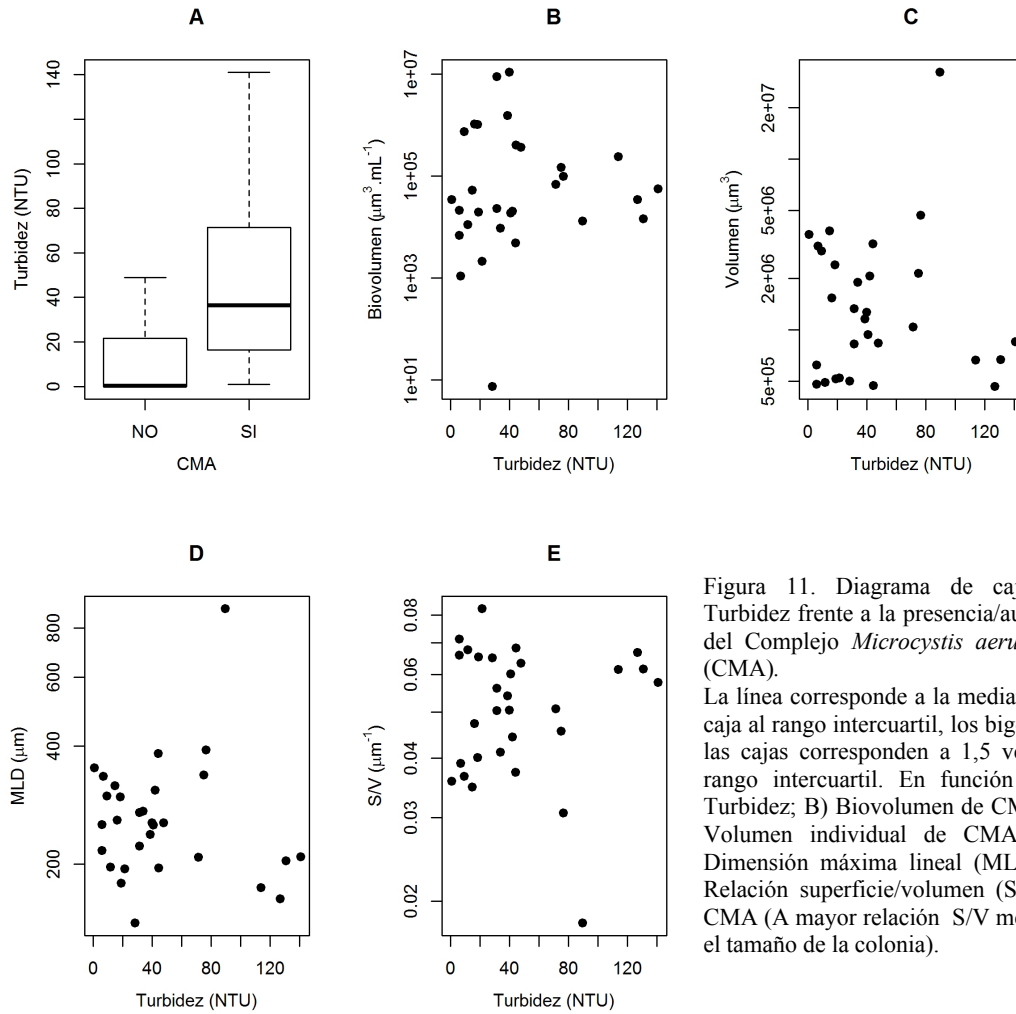


Figura 11. Diagrama de cajas de Turbidez frente a la presencia/ausencia del Complejo *Microcystis aeruginosa* (CMA).

La línea corresponde a la mediana y la caja al rango intercuartil, los bigotes de las cajas corresponden a 1,5 veces el rango intercuartil. En función de la Turbidez; B) Biovolumen de CMA ,C) Volumen individual de CMA , D) Dimensión máxima lineal (MLD), E) Relación superficie/volumen (S/V) de CMA (A mayor relación S/V menor es el tamaño de la colonia).

Discusión

Estimación de volumen individual

Se encontraron diferencias importantes en la estimación del volumen individual al emplear 1, 2 o 3 dimensiones, esfera, esferoide prolado y elipsoide respectivamente. Se sugiere que a diferencia de lo recomendado por otros autores (Hillebrand et al., 1999; Sun & Liu, 2003) se utilicen al menos dos dimensiones para calcular el volumen para evitar la sobreestimación de la biomasa de los organismos del CMA. Esto es particularmente más relevante en aquellas colonias que tengan un MLD mayor a 200 μm donde las sobreestimaciones pueden llegar a ser de entre 2 y 8 mayores. Otros autores han propuesto una solución alternativa a este problema calculando el biovolumen por esfera o elipsoide prolado y multiplicando luego el volumen de la colonia por un factor, considerando el espacio libre entre las células que es una característica taxonómica (Medeiros Fonseca et al., 2014). Este tipo de aproximación no soluciona la dificultad morfológica sino que agrega otro inconveniente a mejorar referido a la densidad de células y como están distribuidas éstas dentro de la colonia.

Debido a la dificultad de estimar todas las dimensiones necesarias y en particular la profundidad en los monitoreos de rutina sería necesario contar con un modelo para la estimación de esta dimensión, sin embargo, la validación realizada de la estimación de la profundidad mediante el modelo múltiple tuvo una pobre capacidad de predicción. Aun así la potencialidad de contar con este tipo de herramientas es muy útil y es por eso que se cree pertinente seguir trabajando en el mismo.

Muestreo con red de arrastre

La red como instrumento de muestreo resultó un buen complemento a la botella, especialmente para la detección de colonias del CMA cuando éstas se encuentran en bajas abundancias. Varios trabajos publicados por Lehman et al., 2003, 2005, 2007, 2010, destacan la implementación de redes mayores a 75 μm de malla. Recomiendan esta metodología para asegurar la colecta de las formas coloniales de *M. aeruginosa*, Los arrastres tienen una duración de entre 1 y 10 minutos dependiendo de la concentración de organismos. En comparación con la red, la utilización de la botella está sesgada a un umbral de biomasa mayores a $1,0 \times 10^5 \text{ um}^3\text{mL}^{-1}$. Para organismos cuyo biovolumen se encuentre por debajo de este valor el método puede llevarnos a emitir falsos negativos. La implementación de la red no pretende sustituir a la botella, ya que está limitada a organismos mayores a 100 μm , por lo que no sería representativo de la comunidad fitoplanctónica. Las diferencias encontradas a altos valores de biovolumen en favor de la botella pueden deberse a la colmatación que sufre la red cuando hay altas concentraciones de biomasa. Lehman et al., 2005, sugiere que la utilización de un diámetro de apertura de entre 0,50 y 0,75 m. permite capturar mejor las colonias evitando la colmatación por el tamaño de malla de la red.

El compromiso existente entre la pérdida de información sobre los organismos menores a 100 μm es compensado en el hecho de que las colonias mayores a 100 μm son las que tienen una mayor probabilidad de desarrollarse en genotipos tóxicos (Kurmayer et al., 2003). Son también las que logran una mejor flotación respecto a las colonias pequeñas, y por lo tanto son capaces de formar densas acumulaciones superficiales ya que pueden resistir mejor el forzamiento de los vientos y ondas de corriente presentes en la superficie del agua en lagos (Zhu et al., 2014; Lin et al., 2014).

En este trabajo se sugiere que la red sería especialmente útil para sistemas de predicción y detección temprana de floraciones del CMA, ya que detecta su presencia en abundancias extremadamente bajas, permitiendo combinar esta información con otras variables ambientales que pueden ayudar en la predicción.

Morfología

Los organismos encontrados fueron todos adecuadamente clasificados en el GFBM VII coincidiendo en general con los rasgos esperados para este grupo. El volumen individual presentó un rango amplio de entre $1,0e+4$ y $1,0e+8 \mu\text{m}^3$ sobrepasando los mayores valores del GFBM VII ($10,9 - 2,4e+6 \mu\text{m}^3$). De forma similar el MLD y la relación S/V, presentaron valores de entre 70 y $200 \mu\text{m}$ y 0,01 y $0,2 \text{ m}^{-1}$ respectivamente, siendo más amplios que los observados para el GFBM VII, $3,5 - 244 \mu\text{m}$ y $0,0 - 6,0 \text{ m}^{-1}$. Las limitaciones que presenta el trabajo de Kruk et al., 2010) radican en que esta realizado unicamente en lagos y que el método de muestreo utilizado fue con botella por lo que está limitado a los rangos de tamaño registrados (Kruk et al., 2010). El aporte de este trabajo a la clasificación GFBM es incluir el registro de rangos de tamaños mas amplios para el grupo VII y con ello reafirmar las características que definen a este grupo.

Biovolumen

Los valores de biovolumen encontrados en Salto correspondieron a valores por encima del nivel I de vigilancia ($2,0e5 \mu\text{m}^3\text{mL}^{-1}$) para aguas recreacionales propuesto por la Organización Mundial de la Salud (Chorus, 2012). Carmelo y Colonia costa superaron levemente dicho valor en enero. Son escasos los trabajos que estiman el biovolumen en el área de estudio y esto probablemente se deba a que hasta poco tiempo atrás los protocolos de alerta y vigilancia de aguas de recreación propuestos por la OMS recomendaban el conteo de células y no la estimación de biovolumen (Chorus & Bartram, 1999; Chorus, 2012). Considerando los valores guía propuestos por la OMS para número de células, confirmamos que existen registros de valores por encima del nivel I - $20.000 \text{ celulas.mL}^{-1}$ - (Sathicq et al., 2014) y por encima del nivel II - $100.000 \text{ celulas.mL}^{-1}$ - (O'Farrell et al., 2012).

La observación de floraciones permanentes en Salto coincide con trabajos previos que indican que las condiciones ambientales del sitio favorecen el crecimiento para el género *Microcystis* durante gran parte del año (Vidal, 2002; De León & Chalar, 2003; Chalar, 2009). Salto demás podría actuar como fuente de inóculo para al resto del sistema dependiendo de las condiciones de caudales y precipitaciones en toda la cuenca (Ferrari et al., 2011) que afectan a los organismos así como también determinan la dinámica de apertura y cierre de la represa (O'Farrell et al., 2012). Una vez dispersos en el sistema, los remansos y zonas de costas son regiones con el potencial mantener células vegetativas en el sedimento capaces de crecer cuando las condiciones sean favorables (Ha et al., 2000; Verspagen et al., 2006)

Relación entre el CMA y las condiciones ambientales

Temperatura

De acuerdo con resultados experimentales se espera que las poblaciones de *Microcystis* se desarrollen a temperaturas mayores a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Paerl & Huisman, 2009; Reynolds et al., 1981). Sin embargo, nuestros resultados son acordes con lo indicado para el grupo VII en ecosistemas naturales donde la temperatura no es una de las principales variables para explicar la varianza de dicho grupo (Kruk & Segura, 2012). De manera similar, estudios en un embalse subtropical en Hatbeesport, Sudáfrica registran poblaciones de *Microcystis* en invierno con temperaturas en el entorno de los 12°C (Zohary & Robarts, 1989). Algunos trabajos realizados en el RdIP (Sathicq et al., 2014), el estuario de San Francisco, EEUU (Lehman et al., 2010), Laguna de los Patos, Brasil (Yunes, 2009), y el Lago Taihu, China (Zhu et al., 2014), indican una preferencia del género *Microcystis* por temperaturas de mayores a $15 \text{ }^\circ\text{C}$, la debilidad de estos trabajos es que todos se basan en muestreos de verano. Por otra parte, estas investigaciones están basadas en muestreos con botella, por lo que se subestima la ocurrencia del CMA cuando su abundancia es baja, la cual

probablemente ocurra a menores temperaturas. La ausencia de una marcada relación positiva de biomasa del CMA a mayores temperaturas podría explicarse a que esta es clave para su crecimiento pero no para su ocurrencia y permanencia.

Los cambios en morfología observados en función de la temperatura muestran una diferencia entre lo que ocurre en el ambiente y en condiciones de laboratorio donde no se observan diferencias en morfología con crecimiento a distintas temperaturas (Giordanino et al., 2011). En nuestro caso observamos que se dan los menores tamaños a mayores temperaturas. Esto se explicaría porque altas temperaturas generan condiciones de estabilidad en la columna de agua permitiendo así a los tamaños menores permanecer flotando en superficie (Zhu et al., 2014).

Salinidad

La salinidad fue la variable que más comprometió la ocurrencia y biovolumen del CMA. Si bien fueron pocos los casos con salinidad mayores de 0 se puede confirmar que esta variable no es una barrera para la dispersión de colonias de CMA. En este sentido nuestros resultados coinciden con trabajos previos que observaron CMA a salinidades cercanas a 20 en Piriápolis utilizando botella de 250 mL como método de muestreo (Ferrari & Perez, 2002).

Se encontró la particularidad que frente a un mismo valor de salinidad de 30 hubo dos casos pertenecientes a Montevideo CO y AA en enero. Montevideo CO es el que presenta bajo biovolumen y tamaños grandes, y Montevideo AA presenta mayor biovolumen pero tamaños chicos. La muestra de CO tenía la característica de estar asociada a grandes cantidades de organismos gelatinosos (Filo Ctenophora). La presencia de estos organismos en el RdIP puede ser dominante en periodos cálidos y se asocian con el frente de salinidad (Calliari et al., 2003). La presencia de estos organismos en la red derivó en que algunas CMA quedaran adheridas a los Ctenóforos dificultando su observación al microscopio.

Turbidez

Existen trabajos en los que se indica una relación positiva entre la presencia de cianobacterias filamentosas y turbidez debido a que son los organismos mismos quienes la promueven en lagos someros (Scheffer et al., 1997; Verspagen et al., 2006). En el caso del CMA la turbidez no sería una limitante para la sobrevivencia y establecimiento dado que los organismos se ubican en la superficie (Reynolds et al., 1981). Esto se encuentra sujeto a la fase del ciclo de vida, ya que si los mismos se encuentran en las fases iniciales de crecimiento la turbidez afecta la disponibilidad de luz en el fondo repercutiendo de manera negativa sobre las siguientes fases del ciclo de vida. En el caso de ambientes dinámicos como puede ser un río, la turbidez puede verse asociada a un bajo tiempo de residencia y explicar la limitación del crecimiento o establecimiento de CMA en Fray Bentos, Carmelo y Colonia.

Conclusiones

En resumen, en este trabajo fue posible caracterizar la comunidad de CMA con los métodos y análisis empleados en el sistema RU-RdIP. Se pudo confirmar que valores altos de biovolumen de CMA están asociados a bajas salinidades y altas temperaturas. Respecto al volumen y otros rasgos morfológicos, relacionados con la temperatura ocurrió lo contrario a lo planteado en las hipótesis encontrándose rangos de tamaños menores a mayor temperaturas. Frente a la salinidad los resultados no permiten confirmar que a altos valores los tamaños coloniales sean menores pero si se pudo observar una preferencia por bajos valores de esta variable.

Salto fue el sitio que presentó las temperaturas mas altas, bajos niveles de turbidez, y salinidad 0. Estas condiciones fueron las que sustentaron las mayores biomásas encontradas. Transformándolo

además en fuente de inóculos para el resto del sistema. El resto de los sitios presentaron valores de biomásas entre dos y cinco ordenes de magnitud menores, siendo mas fluctuantes en el tiempo. La salinidad fue una variable clave limitando el desarrollo de grandes biomásas, pero no limitó la presencia del CMA ya que se observaron colonias en condiciones de salinidad desfavorables. Esto podría presentar una peligrosidad aún mayor si consideramos que bajo estrés salino se produce un aumento de toxina extracelular producto de la ruptura de las células (Orr et al., 2004; Tonk et al., 2007).

Estos resultados fueron posibles mediante la aplicación de una metodología de muestreo que permitió disminuir el umbral de detección de biovolumen en comparación con las metodologías convencionales. Asimismo la estimación de biovolumen utilizando una aproximación geométrica más adecuada a una forma tridimensional permitió evitar sobre estimaciones en el volumen individual.

Perspectivas

Como perspectiva de este trabajo se continuará con el análisis de un año completo de muestreo de manera de describir más adecuadamente la dinámica estacional del CMA en el RU y RdIP.

Se cuentan con muestras de todos los sitios fijadas con Paraformaldehído (PFA), almacenadas en oscuridad a 4°C para ser observadas a microscopia confocal en la longitud de onda de excitación de la clorofila y poder realizar construcciones en 3D de las colonias para ver su forma y especialmente profundidad.

Complementario a los análisis aquí realizados se prevé incluir información sobre caudales, niveles y variables meteorológicas (precipitaciones, temperatura del aire y vientos) para evaluar su efecto en la distribución y presencia del CMA.

Asimismo, se pretende seguir implementando y evaluando el muestreador de red para floraciones, especialmente en sistema de detección temprana de los organismos del CMA.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis orientadoras Carla Kruk y Claudia Piccini, por brindarme la oportunidad de realizar esta pasantía en el marco del proyecto denominado “Herramientas para el monitoreo de floraciones cianobacterias nocivas”, además de la confianza y el apoyo brindado durante el desarrollo de mi trabajo. También quiero agradecer a los restantes compañeros del proyecto su buena onda y disposición en el trabajo (Carmela Carballo, Lucia Nogueira, Gabriela Martinez de la Escalera, Maite Colina). Me gustaría agradecer a Angel Segura por sus aportes trabajo, su ayuda con los análisis estadísticos, sobre funcionamiento del programa R y los códigos para realizar los cálculos en el mismo. A Danilo Calliari por sus aportes a la discusión del trabajo especialmente a lo referido la implementación de la red como instrumento de muestreo.

Agradezco a los compañeros de la Sección Limnología por las horas de trabajo compartidas, especialmente los viernes a la tarde y su selección musical. A Fernando Costa y compañeros de laboratorio de Ecología, Etología y Evolución por brindarme un espacio dentro del IIBCE.

A todo mis compañeros de carrera por tantos buenos años dentro de facultad, especialmente a la banda de la palmera y las horas acumuladas corriendo atrás de una pelota, así como los momentos compartiendo inspiradoras ideas.

A las agencias financiadoras ANII y Pedeciba que permitieron dedicarme a mi trabajo a través de sus becas de iniciación en investigación y a la Asociación Uruguaya de Microbiología por su fondo de gastos APIPE 2014.

Por último quiero agradecer a mi familia y amigos por el apoyo incondicional brindado y permitir desarrollar mis estudios con dedicación y vocación.

Referencias

- Boltovskoy, D., N. Correa, F. Bordet, V. Leites, & D. Cataldo, 2013. Toxic *Microcystis* (cyanobacteria) inhibit recruitment of the bloom-enhancing invasive bivalve *Limnoperna fortunei*. *Freshwater Biology* 58: 1968–1981.
- Brena, B., & S. Bonilla, 2009. *Producción de Toxinas y Otros Metabolitos* In Bonilla, S. (ed), *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. UNESCO, Uruguay.
- Burnham, K. P., & D. R. Anderson, 2002. *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. Springer, New York.
- Cabrera Di Piramo, C., L. Rodríguez-Gallego, & C. Kruk, 2013. Efecto de la salinidad y la concentración de nutrientes en las floraciones de cianobacterias de una laguna costera de Uruguay. In Fernández Cirelli, A., A. Pérez Carrera, & A. Volpedo (eds), *El Agua en la Producción Agropecuaria*. .
- Calliari, D., E. Brugnoli, G. Ferrari, & D. Vizziano, 2009. Phytoplankton distribution and production along a wide environmental gradient in the South-West Atlantic off Uruguay. *Hydrobiologia* 620: 47–61.
- Calliari, D., O. Defeo, G. Cervetto, M. Gómez, L. Giménez, F. Scarabino, A. Brazeiro, & W. Norbis, 2003. Marine life of uruguay: critical update and priorities for future research la vida marina de uruguay: revision critica y prioridades para investigaciones futuras. *Gayana* 67: 341–370.
- Calliari, D., M. Gómez, & N. Gómez, 2005. Biomass and composition of the phytoplankton in the Río de la Plata: large-scale distribution and relationship with environmental variables during a spring cruise. *Continental Shelf Research* 25: 197–210.
- Carmichael, W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology* 72: 445–459.
- Chalar, G., 2009. The use of phytoplankton patterns of diversity for algal bloom management. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters* 39: 200–208.
- Chorus, I., 2012. Current approaches to cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries, 63-2012. Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt), Germany, Dessau .
- Chorus, I., & J. Bartram (eds), 1999. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*. E & FN Spon, London ; New York.
- Conde, D., 2009. *Eutrofización, Cambio Climático y Cianobacterias* In Bonilla, S. (ed), *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. UNESCO, Uruguay.
- De León, L., & G. Chalar, 2003. Abundancia y diversidad del fitoplancton en el Embalse de Salto Grande (Argentina-Uruguay). *Ciclo estacional y distribución espacial*. *Limnetica* 22: 103–113.
- De León, L., & J. S. Yunes, 2001. First report of a microcystin-containing bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the La Plata River, South America. *Environmental toxicology* 16: 110–112.
- Ferrari, G., M. del Carmen Perez, M. Dabezies, D. Miguez, & C. Saizar, 2011. Planktic Cyanobacteria in the Lower Uruguay River, South America. *FOTTEA* 11: 225–234.
- Ferrari, G., & M. del C. Perez, 2002. Phytoplankton of the Uruguayan platense and Atlantic coast (1993-1994). *Iheringia, Serie Botanica* 57: 263–278.
- Gaedke, U., 1992. The size distribution of plankton biomass in a large lake and its seasonal variability. *Limnology and Oceanography* 37: 1202–1220.
- Garcia, M. D., & N. Bonel, 2014. Environmental modulation of the plankton community composition and size-structure along the eutrophic intertidal coast of the Río de La Plata estuary, Argentina. *Journal of Limnology* 73:;

<http://www.jlimnol.it/index.php/jlimnol/article/view/jlimnol.2014.911>.

Giordanino, M. V. F., S. M. Strauch, V. E. Villafaña, & E. W. Helbling, 2011. Influence of temperature and UVR on photosynthesis and morphology of four species of cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 103: 68–77.

Guerrero, R. A., E. M. Acha, & C. A. Lasta, 1997. Physical oceanography of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Continental Shelf Research* 17: 727–742.

Ha, K., H.-W. Kim, K.-S. Jeong, & G.-J. Joo, 2000. Vertical distribution of *Microcystis* population in the regulated Nakdong River, Korea. *Limnology* 1: 225–230.

Hillebrand, H., C.-D. Dürselen, D. Kirschtel, U. Pollinger, & T. Zohary, 1999. Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae. *Journal of Phycology* 35: 403–424.

Kalff, J., 2002. *Limnology: inland water ecosystems*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Komárek, J., & J. Komárková, 2002. Review of the European *Microcystis*-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology, Olomouc* 2: 1–24.

Kruk, C., V. L. M. Huszar, E. T. H. M. Peeters, S. Bonilla, L. Costa, M. Lüring, C. S. Reynolds, & M. Scheffer, 2010. A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology* 55: 614–627.

Kruk, C., N. Mazzeo, G. Lacerot, & C. Reynolds, 2002. Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *Journal of plankton Research* 24: 901–912.

Kruk, C., & A. M. Segura, 2012. The habitat template of phytoplankton morphology-based functional groups. *Hydrobiologia* 698: 191–202.

Kruk, C., C. Suárez, M. Ríos, N. Zaldúa, & D. Martino, 2013. Ficha: Análisis Calidad de Agua en Uruguay. 9, <http://vidasilvestre.org.uy/wp-content/uploads/2013/09/informeaguafinalcm1.pdf>.

Kruk, C., L. Vidal, L. Aubriot, S. Bonilla, & B. Brena, 2009. Metodologías de Análisis de Cianobacterias In Bonilla, S. (ed), *Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión*. UNESCO, Uruguay.

Kurmayer, R., G. Christiansen, & I. Chorus, 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* 69: 787–795.

Lehman, P. W., G. Boyer, C. Hall, S. Waller, & K. Gehrts, 2005. Distribution and toxicity of a new colonial *Microcystis aeruginosa* bloom in the San Francisco Bay Estuary, California. *Hydrobiologia* 541: 87–99.

Lehman, P. W., G. Boyer, M. Satchwell, & S. Waller, 2007. The influence of environmental conditions on the seasonal variation of *Microcystis* cell density and microcystins concentration in San Francisco Estuary. *Hydrobiologia* 600: 187–204.

Lehman, P. W., S. J. Teh, G. L. Boyer, M. L. Nobriga, E. Bass, & C. Hogle, 2010. Initial impacts of *Microcystis aeruginosa* blooms on the aquatic food web in the San Francisco Estuary. *Hydrobiologia* 637: 229–248.

Lin, L., G. Appiah-Sefah, & M. Li, 2014. Using a laser particle analyzer to demonstrate relationships between wind strength and *Microcystis* colony size distribution in Lake Taihu, China. *Journal of Freshwater Ecology* 1–9.

Mazur, H., & M. Pliński, 2001. Stability of cyanotoxins, microcystin-LR, microcystin-RR and nodularin in seawater and BG-11 medium of different salinity. *Oceanologia* 43: 329–339.

Medeiros Fonseca, B., C. Ferragut, A. Tucci, L. O. Crossetti, F. Ferrari, D. de Campos Bicudo, C. L. Sant'Anna, & C.

- E. de Mattos Bicudo, 2014. Biovolume de cianobactérias e algas de reservatórios tropicais do Brasil com diferentes estados tróficos. 41: 9–30.
- Mitulețu, M., B. Drugă, A. Hegedus, C. Coman, & N. Dragoș, 2013. Phylogenetic analysis of microcystis strains (cyanobacteria) based on the 16S-23S rDNA and cpba-igs markers. *Annals of RSCB* 18:
- Moss, B., S. Kosten, M. Meerhof, R. Battarbee, E. Jeppesen, N. Mazzeo, K. Havens, G. Lacerot, Z. Liu, & L. De Meester, 2011. Allied attack: climate change and eutrophication. *Inland waters* 1: 101–105.
- Nagy, G. J., J. López Laborde, & L. Anastasia, 1987. Caracterización de ambientes en el Río de la Plata Exterior (salinidad y turbiedad óptica). *Inv. Oceanológicas* 1: 31–56.
- Nagy, G., M. Gómez-Erache, C. López, & A. Perdomo, 2002. Distribution patterns of nutrients and symptoms of eutrophication in the Rio de la Plata River Estuary System. *Hydrobiologia* 475: 125–139.
- O'Farrell, I., F. Bordet, & G. Chaparro, 2012. Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: validation of dominant eco-strategies. *Hydrobiologia* 698: 175–190.
- Orr, P. T., G. J. Jones, & G. B. Douglas, 2004. Response of cultured *Microcystis aeruginosa* from the Swan River, Australia, to elevated salt concentration and consequences for bloom and toxin management in estuaries. *Marine and Freshwater Research* 55: 277.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, S. Matsumoto, & M. M. Watanabe, 2000. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *The Journal of general and applied microbiology* 46: 39–50.
- Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto, & M. M. Watanabe, 1999. Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research* 47: 189–197.
- Paerl, H. W., R. S. Fulton, P. H. Moisaner, & J. Dyble, 2001. Harmful Freshwater Algal Blooms, With an Emphasis on Cyanobacteria. *The Scientific World JOURNAL* 1: 76–113.
- Paerl, H. W., & J. Huisman, 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports* 1: 27–37.
- R Core Team, 2013. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, //www.R-project.org/.
- Reynolds, C. S., 2007. Variability in the provision and function of mucilage in phytoplankton: facultative responses to the environment. *Hydrobiologia* 578: 37–45.
- Reynolds, C. S., V. Huszar, C. Kruk, L. Naselli-Flores, & S. Melo, 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of plankton research* 24: 417–428.
- Reynolds, C. S., Jaworski, G.H.M., Cmiech, H. A., & Leedale, G. F., 1981. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* kütz. Emend. Elenkin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 293: 419–477.
- Reynolds, C. S., & A. Walsby, 1975. Water-blooms. *Biological reviews* 50: 437–481.
- Rodriguez-Ramos, T., M. Dornelas, E. Maranon, & P. Cermeno, 2014. Conventional sampling methods severely underestimate phytoplankton species richness. *Journal of Plankton Research* 36: 334–343.
- Romo, S., J. Soria, F. Fernández, Y. Ouahid, & Ángel Barón-Solá, 2013. Water residence time and the dynamics of toxic cyanobacteria: *Water residence time and toxic cyanobacteria. Freshwater Biology* 58: 513–522.
- Sathicq, M. B., N. Gómez, D. Andrinolo, D. Sedán, & J. L. Donadelli, 2014. Temporal distribution of cyanobacteria in

the coast of a shallow temperate estuary (Río de la Plata): some implications for its monitoring. *Environmental Monitoring and Assessment* 186: 7115–7125.

Scheffer, M., S. Rinaldi, A. Gragnani, L. R. Mur, & E. H. van Nes, 1997. On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology* 78: 272–282.

Sienra, D., & G. Ferrari, 2006. Monitoreo de cianobacterias en la costa de Montevideo (Uruguay). *Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya*, Montevideo 403–420.

Soares, M. C. S., V. L. M. Huszar, M. N. Miranda, M. M. Mello, F. Roland, & M. Lüring, 2013. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia* 717: 1–12.

Sun, J., & D. Liu, 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25: 1331–1346.

Tonk, L., K. Bosch, P. M. Visser, & J. Huisman, 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Microbial Ecology* 46: 117.

Verspagen, J. M., J. Passarge, K. D. Jöhnk, P. M. Visser, L. Peperzak, P. Boers, H. J. Laanbroek, & J. Huisman, 2006. Water management strategies against toxic *Microcystis* blooms in the Dutch delta. *Ecological applications* 16: 313–327.

Vidal, L., 2002. Variación temporal de la morfología de *Microcystis aeruginosa* Kützing (Cyanophyceae) en el Embalse de Salto Grande (Uruguay - Argentina). *Pasantía de Grado, Universidad de la Republica- Facultad de Ciencias*.

Vidal, L., & A. Britos, 2012. URUGUAY: Occurrence, Toxicity and Regulation of Cyanobacteria. *Current approaches to Cyanotoxin risk assessment, risk management and regulations in different countries* 130.

Vidal, L., A. Fabre, L. Gabito, C. Kruk, A. Gravier, A. Britos, M. del Carmen Péres, L. Aubriot, & S. Bonilla, 2009. *Fichas de Identificación de las Especies In Bonilla, S. (ed), Cianobacterias Planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. UNESCO, Uruguay.*

Yunes, J. S., 2009. *Florações de Microcystis na Lagoa dos Patos eo seu estuário: 20 anos de estudos.* .

Zhu, W., M. Li, Y. Luo, X. Dai, L. Guo, M. Xiao, J. Huang, & X. Tan, 2014. Vertical distribution of *Microcystis* colony size in Lake Taihu: Its role in algal blooms. *Journal of Great Lakes Research* 40: 949–955.

Zohary, T., & R. D. Robarts, 1989. Diurnal mixed layers and the long-term dominance of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research* 11: 25–48.